



TITLE:

インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン蛋白質の膜融合活性(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

川崎, 一則

CITATION:

川崎, 一則. インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン蛋白質の膜融合活性. 京都大学, 1985, 理学博士

ISSUE DATE:

1985-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k3250>

RIGHT:

学 位 審 査 報 告

氏 名	川 崎 一 則
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	昭 和 年 月 日
学位授与の要件	学位規則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専 攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
(学位論文題目) インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン蛋白質の膜融合性 <div style="text-align: right;">活</div>	
論文調査委員	主 査 大 西 俊 一 柳 田 充 弘 大 井 龍 夫

理 学 研 究 科

(論文内容の要旨)

インフルエンザウイルスの外膜に存在するヘマグルチニン蛋白質 (HA) は、ウイルスの細胞への侵入に関わる 2 つの機能をもつ。一つはウイルス受容体への結合であり、これによってウイルスは宿主細胞表面に吸着することができ、それに引き続きエンドサイトーシスによって細胞内部へ取り込まれる。もう一つの機能は弱酸性に限って現われる膜融合活性である。これによって、エンドサイトーシスによって取り込まれたウイルスが、エンドソーム内が酸性になったときに膜融合を起こし、ウイルスゲノムを細胞質に移すことを可能にしている。このように、HA が酸性で現わす膜融合活性はウイルス感染初期の重要な機能であるが、その膜融合の機構はまだ明らかでない。申請者は、この問題を、ウイルス側および標的細胞膜側をそれぞれ再構成系に置き換え、単純化した系を用いて研究し、膜融合の分子機構を明らかにしようとしたものである。

申請者は、まず、界面活性剤トリトン X-100 を用いてウイルス外膜より HA を可溶化し単離した。これはロゼット状の会合体を形成する。そして、この HA ロゼットそのものが、酸性で溶血活性をもつことを示した。つぎに界面活性剤存在下で、HA とフォスファチジルコリン-コレステロールを混合し、透析法により再構成小胞を調製した。この再構成小胞は赤血球凝集を起こし、酸性で溶血や赤血球の細胞融合を引き起こした。またスピンドラベルを用いて、この再構成小胞と赤血球膜の融合を直接測定したところ、元のウイルスと同じ pH 依存性を持ち、同じ速さと効率で融合することが示された。ただし、再構成小胞中のコレステロール含量が高い程、また脂質に対する HA の量比が大きい程、膜融合の効率が低い。申請者は、さらに、アルキル化したガラス上に HA 再構成膜を作成することを試みている。すなわち、予めオクタデシルトリクロロシランを反応させたカバーガラスを、HA と脂質の界面活性剤混合液中に入れ、透析を行なった。このカバーガラスは赤血球を吸

着し、酸性条件で溶血を引き起こした。この結果は、HAの機能を保持してガラス表面上に再構成膜が形成されたことを示すものであり、蛍光ラベルなどの導入により、光学顕微鏡下でHAの動的状態の研究を可能にしたものである。

最後に、標的細胞膜の再構成系として、このウイルスの受容体である赤血球膜グリコフォリンを抽出精製し、それをフォスファチジルコリンとコレステロールの小胞に再構成している、スピララベルしたインフルエンザウイルスを用いて、この再構成膜との融合反応を測定したところ、元の赤血球膜の場合と同様に酸性で活性化されることが明らかにされた。その融合効率は、グリコフォリン含量とともに増大し、重量にして0.6倍以上含む場合は赤血球膜と同じ効率をもつことが示された。このようにして、適当な条件を選ぶことにより、元のウイルスと同じ機能をもつHA再構成小胞、および元の標的細胞膜と同じ働きをもつ受容体再構成膜が調製された。

参考論文二篇は、インフルエンザウイルスと脂質リボソームの相互作用に関するもの、およびインフルエンザウイルスと培養細胞の相互作用に関するもので、いずれも本論文と密接に関係したものである。

(論文審査の結果の要旨)

外膜をもつウイルスの細胞内侵入機構の解明のために、外膜と標的細胞膜の融合の分子機構を明らかにすることはきわめて重要である。インフルエンザウイルスは酸性で膜融合活性をもつために、標的細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれた後に、エンドソームの酸性条件下で膜融合を起こして、ゲノムを細胞質に移すことが知られている。その膜融合活性をにやう外膜蛋白質ヘマグルチニン(HA)については、その一次構造のみならず立体構造も明らかにされており、融合反応の分子機構を研究するのにきわめて適している。申請者は、このHAがにやう膜融合反応を、種々の再構成系を用い単純化あるいは要素化した系について研究し、その分子機構解明への道を拓いたものである。

申請者は、ウイルスの再構成系として、まず、HAをフォスファチジルコリンとコレステロールの小胞に再構成したものを調製し、その赤血球膜との融合反応が酸性で活性化されることを見出した。膜融合の効率、再構成小胞中のHA含量およびコレステロール含量とともに増大し、適当な含量のものは元のウイルスと同じ効率をもつことを明らかにしている。これに対し、膜融合のpH依存性や融合速度は、これらの含量にはあまり依存せず元のウイルスの場合と同じであった。つぎに、スライドガラス板上にHAの再構成膜を作製し、それが酸性での溶血活性をもつことを観察している。

標的細胞膜の再構成系としては、赤血球膜におけるウイルス受容体グリコフォリンを用い、それをフォスファチジルコリンとコレステロールに再構成したものを研究している。インフルエンザウイルスはこの再構成膜と酸性で融合すること、その融合効率は再構成膜のグリコフォリン含量とともに増大し、重量百分率0.6%以上ふくまれる場合は、元の赤血球膜と同じ効率が得られることを明らかにしている。

これらの研究成果から、膜融合反応における外膜上のHAの存在密度、コ

レステロールの役割、標的細胞膜における受容体の役割について明確な知見が得られており、膜融合の分子機構解明に貢献するところが大きい。その成果は、さらに膜融合の研究にとどまらず、生体膜の動的構造と機能の関係の研究に対しても基礎的に重要な貢献であり、また一方ではウイルスの細胞内侵入機構に対して直接的な寄与をなすものである。参考論文2篇もいずれもインフルエンザウイルスに関するもので、主論文とともに申請者の優れた研究能力を示している。

以上の審査結果から、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心に、それに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。

学位申請論文

インフルエンザウイルス
ヘマグルチニン蛋白質の
膜融合活性

京都大学大学院理学研究科
生物物理学専攻
量子生物学講座

川崎 一 則

目次

1、略語表	1
5 2、序論	
(1) IFVの細胞侵入機構	2
(2) HAの2つの機能	7
(3) IFV外膜融合の 分子レベルでの研究	10
10 (4) この研究の目的と概要	11
3、材料と方法	
(1) 脂質	16
(2) 緩衝液	16
(3) 蛋白質定量とリン定量	17
15 (4) ウイルス	17
(5) HAロゼットとHA再構成膜	17
(6) 赤血球とゴースト	21
(7) グリコフォリン再構成膜	21
(8) PC* 移行反応の測定	22
(9) 赤血球凝集と溶血	26

(10) カバーガラスのアルキル化 27

(11) 電子顕微鏡による観察 28

4. 結 果

(1) HAロゼットと

HA再構成膜の調製 30

(2) HA再構成膜と赤血球の反応 37

(3) HA再構成膜と

赤血球ゴーストの膜融合 42

(4) P/L比とコレステロール含量 47

(5) アルキル化した

ガラス表面上へのHAの再構成 55

(6) IFVと

グリコフォリン再構成膜の膜融合 57

5. 考 察 63

6. 謝 辞 72

7. 文 献 73

1、略語表

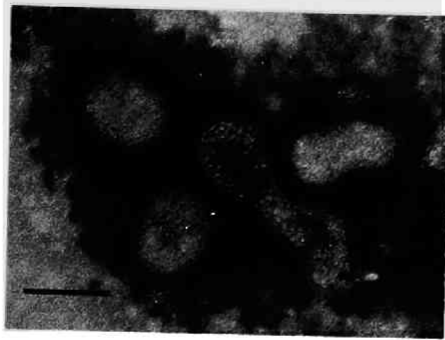
BHA	bromelain-released hemagglutinin
HA	hemagglutinin
IFV	influenza virus
IMP	intramembrane particle
M	membrane protein
NA	neuraminidase
NP	nucleoprotein
PC	phosphatidylcholine
PC*	spin-labeled phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethane-sulfonic acid)
P/L	protein/lipid
PS	phosphatidylserine
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

2. 序 論

(1) IFVの細胞侵入機構

インフルエンザウイルス (IFV) はオルトミクソウイルス科に属し直径約100nmのほぼ球形をしたウイルスで、遺伝子RNAを含むコアとそれを包む外膜より構成されている(図1)。そのためコアが外膜を脱ぎす⁵てて遺伝子が宿主細胞質中に解放されることが、ウイルスの増殖には必要条件であり、そのための何らかの機構が保証されていなければならないが、1980年に至るまで明解な理解はなされていなかった。この年、前田と大西が酸性条件下でIFVが膜融合反応を引き起こすことを発見したことが⁽²⁾きっかけとなり、現在ではIFVが実に巧妙な仕掛けを使って宿主への感染の開始を可能にしていることが明らかにされている(図2B)。①IFV

A



B

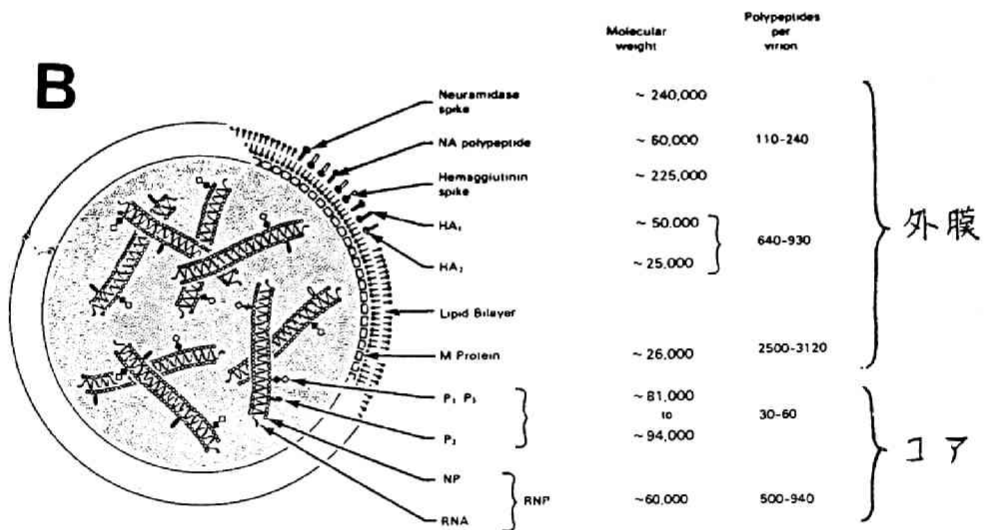


図 1、

A、IFVのネガティブ染色像 (Bar = 100 nm)。

B、IFVの構造を示す模式図 (文献1より)。

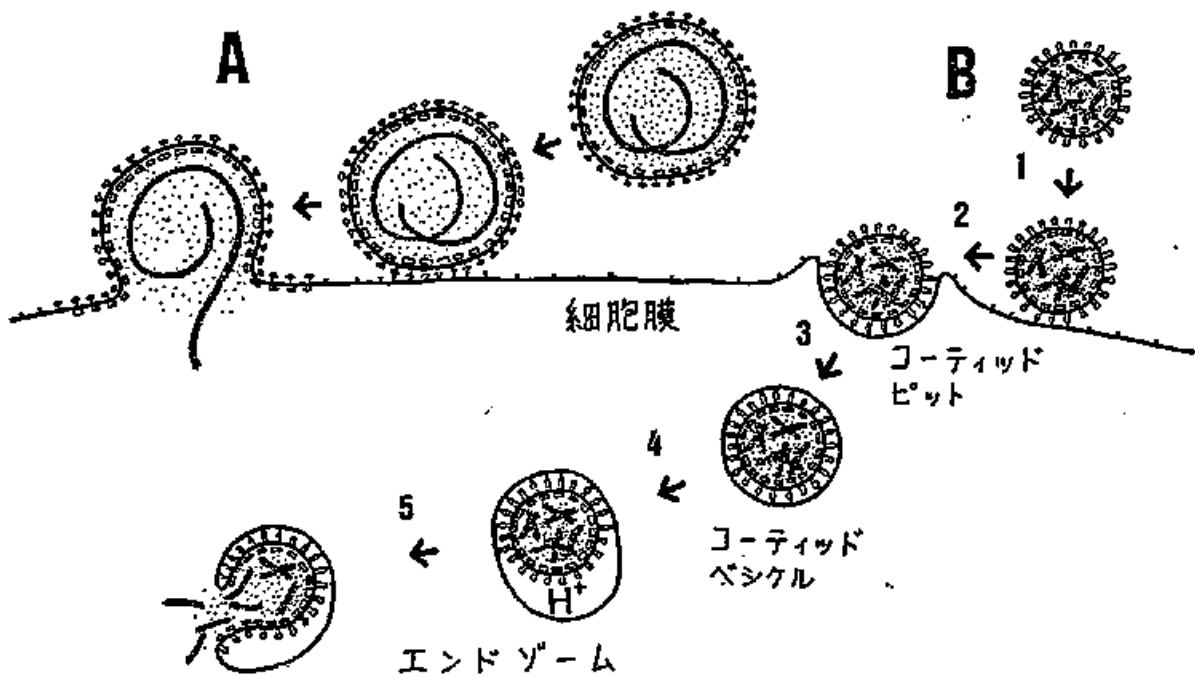


図 2、

ロタウイルス(A)とIFV(B)の細胞
侵入機構を示す模式図。

は細胞表面のウイルス受容体に結合し、②コーティッドピットより細胞にエンドサイトシスされ、③コーティッドベニクル中に取り込まれる。コアは一旦2枚の膜に包まれることになる。④続いてリソゾームへ至る前のエンドゾームの段階で、⑤内部が酸性環境となる^(3,4)のでウイルス外膜とエンドゾーム膜が融合し、コアは二重の包囲を一度に破ることができ⁽⁵⁾る。この細胞の物質取り込み機構をうまく利用した侵入経路は、IFVとよく似た構造や性状を持ちながら細胞表面で外膜融合をする、セ⁽⁵⁾ンダイウイルスなどのパラミクソウイルス科のもの(図2A)とは一線を画する。IFVの細胞内部での外膜融合は、セ⁽⁵⁾ンダイウイルスの場合に見られる、細胞膜の損傷(サイトリシス)や宿主細胞どうしの融合などの細胞の死につながりうる現象を生じない点で、後者より増殖のために有利だと思われる。

IFVの酸性条件に限られた膜融合造性は、その後A型^(6,7,8)、B型⁽⁹⁾、C型^(10,11)の多くの株について

確認された。また吉村らがエンドゾームヤリ
ソゾームの内部 pH を上昇させる弱塩基類が
ウイルス増殖を阻害することを示し⁽¹²⁾、またウ
イルス粒子が実際に細胞内部で酸性に晒され
ることを、蛍光標識法によって示した⁽¹³⁾ので、
IFV はすべてエンドゾーム経由で細胞に侵
入することが確実になった。IFV のほかに
も、酸性条件下に限って膜融合活性を持つウ
イルスが多数報告されている（トガウイルス
科のセムリキ森林ウイルス⁽¹⁴⁾、シンドビスウイ
ルス⁽¹⁴⁾、ルベラウイルス⁽¹⁵⁾、ラ・クロスウイルス⁽¹⁶⁾、
ラブドウイルス科の水疱性口内炎ウイルス⁽⁶⁾、
狂犬病ウイルス⁽¹⁷⁾、レトロウイルス科のマウス
乳癌ウイルス⁽¹⁸⁾など）。外膜を持つウイルスの
細胞侵入経路として、図 2 に示したように①
pH 非依存的に細胞膜と外膜融合するものと、
② pH 依存性でエンドゾームを経由するもの
との 2 つの道筋があると考えられるようにな
っている。^(19, 20)

(2) HAの2つの機能

IFV外膜に存在するヘマグルチニン(HA)蛋白質は、このような細胞への侵入過程において中心的な役割を果たしている。

IFVの外膜は通常の生体膜と同様の構造で、脂質二分子層中を2種類の糖蛋白質(HAとニューラミニデイス; NA)が貫通して埋め込まれており、内側にはM蛋白質が結合している(図1B)。HAは分子量75,000 - 80,000の分子が三量体として⁽²¹⁾、直径約40⁽²²⁾ Å、長さ約140 Åのスパイクを形成している。ブロムライン処理によってHA三量体の外膜から突出した部分が得られているが(BHA¹⁵)、WileyらはX線回折によって、このBHA全体の立体構造を明らかにしている⁽²³⁾。

HAの細胞侵入機構への関与は2つの独立した機能に基づいている。第1の機能は細胞表面のウイルス受容体への結合である。HAの各単量体の頭部にポケット状の受容体結合

部位があり、これが末端にシアル酸を持つ糖鎖を認識して、⁽²⁴⁾株や糖鎖構造によって異なる特異性で結合をする。^(25,26,27)IFVを赤血球に加えた場合には、HAのこの機能によって赤血球の凝集が引き起こされる。図2Bの①-④の過程がこの受容体への結合によって達成される。

第2の機能が膜融合活性である。MDCKなどの培養細胞で増殖したIFVは、1本のポリペプチド鎖からなる前駆体HA(HA₀)を持つ。^(28,29)このウイルスは受容体への結合活性を持つが、外膜融合活性や溶血活性、細胞への感染性を持たない。これをトリプシン処理すると、HA₀だけが2本のポリペプチド鎖(HA₁とHA₂)に切断されるという修飾を受け、⁽³⁰⁾外膜融合活性や溶血活性、細胞融合活性、^(30,31)感染性のすべてが発現されるようになる。⁽³²⁾これはHAが膜融合活性を担っていることを明らかにしたばかりでなく、外膜融合がウイルスの感染に不可欠であることをも示している。

このトリプシン処理で生じたHA₂のアミノ末端部分のアミノ酸配列は、疎水的性質が強く、また株の間で非常に良く保存されている⁽³³⁾。さらにセンダイウイルスの膜融合蛋白質Fについても、F₀からF₁とF₂への活性化が知られているが、ここで生じるF₁のアミノ末端部分もHA₂のものと酷似している。このことから、HA₂のアミノ末端部分が膜融合活性の活性中⁵心ではないかと推定されている。F₁のこの部分がすべて疎水性アミノ酸で構成されているのに対し、HA₂では2-3個の酸性アミノ酸が挿入されている。これがIFVのpH依存性の膜融合活性の原因であると考えられている⁽³⁰⁾。

White⁽³⁴⁾らは、SV40をベクターとしてHA遺伝子のcDNAを培養細胞に導入し、細胞表面にHAを発現するようになったこの細胞が、酸性で細胞融合を起こすことを示した。また、56°C処理によってNAを完全に失活させたIFVが、溶血活性⁽³⁵⁾や外膜融合活性⁽³⁶⁾

を全く失わないことから、HAが膜融合活性の担体であることが確認されている。HAのこの機能により図2Bの⑤の段階が達成される。

(3) IFV外膜融合の分子レベルでの研究

HAをIFVからBHAとして単離したり、本研究でも取り扱うHAの会合体(HAロゼット)として単離することによって、酸性でのHAの構造変化や、リポソームとの相互作用などについての研究が成されている。BHAは酸性化によってCDスペクトルに変化が生じ、表面部分の疎水性が増大する。⁽³⁷⁾ BHAも⁽³⁷⁾ HAロゼットも⁽³⁸⁾ HAがトリプシンに対して感受性になる。BHA⁽³⁷⁾だけを酸性にした場合も、HAロゼット⁽³⁸⁾だけを酸性にした場合も、HAどうしの大きな凝集塊が形成される。リポソーム共存下のときは酸性化に伴って、BHA^(37,39)もHAロゼット^(38,40)もリポソームへの吸着を生じ

る。リポソームへの吸着は、HA₂の一部がリポソームの脂質層へ埋め込まれる形で起きている。^(39,40) 以上の変化はすべて不可逆的なものである。また、酸性化に伴いHAの抗原性が大きく変化することからも、HAの立体構造の変化が報告されている。^(41,42)

前田⁽³⁰⁾らとWhite⁽⁴³⁾らは、IFVとリポソームとの膜融合を調べ、融合の相手となる膜の性質についての報告をしている。IFVは受容体¹⁰を含まないリポソームにも吸着を起こし、酸性ではす早く（37℃では2分以内）外膜融合を生じる。この反応はどのような脂質組成のリポソームとも起こり、例えばコレステロール要求性は認められない。また脂質層が¹¹液晶相であるか固相であるかにもよらない。

(4) この研究の目的と概要

一般に膜蛋白質の研究では、複雑な生体膜そのものの⁵中の現象を分子レベルで解明し¹⁰

ていくのは容易でないことが多く、また膜から抽出した蛋白質だけを用いた実験では、それがどの程度膜上での反応と関連しているかの保証が難しい。この点、再構成膜を用いた実験は、構成分子の組成コントロールが可能であり、膜蛋白質の本来の存在状態を確保できるので有力である。そのため様々な膜蛋白質の再構成膜が調製されている。⁽⁴⁴⁾とりわけ膜融合蛋白質のように、膜と構造と深く関った機能を持つ蛋白質を理解するためには、再構成膜を用いた研究が不可欠である。HAについて言えば、発病性の危険のないフクチン^(45,46)としての可能性を模索した再構成膜の報告はあ
るが、本来の機能である膜融合に着目した研究は
まだ不十分である。また膜融合の相手となる膜の側の再構成を行ない、外膜融合でのIFV受容体の意義を調べた研究もほとんど
されていない。

本研究はHAが誘導する膜融合の分子機構の解明を目的として、IFV外膜側の再構成

系と、膜融合の相手となる膜の側の再構成系を、調製し、そこで生じる膜融合反応を検討したものである。第1に、HA再構成小胞の調製とその活性の検討を行なった。まず界面活性剤 Triton X-100 によつて、IFV 外膜から HA を抽出し HA ロゼットを調製した。次にこれと精製した脂質（ホスファチジルコリン；PC とコレステロール）のみから、Triton X-100 透析法によつて小胞状の再構成膜を調製した。小胞に取り込まれなかった HA ロゼットを、ゲル濾過法によつて分離した。コレステロールを含まない場合には HA ロゼットだけが形成され、小胞は形成されなかった。HA ロゼットは赤血球凝集活性と pH 依存性の溶血活性を持っていたが、細胞融合活性は無かった。それに対し小胞状の HA 再構成膜は、この3つの活性すべてを再現していた。さらに、スポンラベル法による解析の結果、この再構成膜は元の IFV と同様の pH 依存性や時間依存性の強い膜融合活

性を持つことが解った。この膜融合は、HA再構成膜のコレステロール含量が多い場合に、効率良く起こった。これより、HAは外膜側のコレステロールに限って脂質要求性を持つことが示された。また蛋白質/脂質 (P/L) 比の増大に従って膜融合の効率が高まることから、外膜融合は複数のHAスパイクが、酸性で同時に作動することによって引き起こされることが示唆された。

第2に、HAの膜内での運動状態と、その酸性化による変化を解析するための実験系として、アルキル化したガラス上にHAを再構成する試みを行なった。オクタデシルトリクロロシランでアルキル化したカバーガラスを、HAとPCとコレステロールをTriton X-100で可溶化した液中に入れ、透析を行なって、Triton X-100を除いた。このカバーガラスには赤血球の吸着が起こり、酸性では溶血が観察された。HAが活性を持った状態で、ガラス上に再構成されたものと思われる。

第3に、IFV受容体として赤血球グリコ
 フォリンを、PCとコレステロールからなる
 脂質膜上に再構成し、IFVの外膜融合に及
 ぼす影響を調べた。IFVはグリコフォリン
 再構成膜と酸性において効率良く外膜融合を
 生じた。グリコフォリンを含まない場合の約
 4.5倍の促進が見られた。これより外膜融合
 の段階においても、酸性化に伴ってHAが効
 率よく相手の膜に作用するためには、HAが
 受容体によって膜表面に保持されていること
 が必要であることが示された。

15

3. 材料と方法

(1) 脂質

PCはSingletonらの方法⁽³⁷⁾で鶏卵の卵黄より抽出、精製した。スピラブルしたPC(PC*)はHubbellとMcConnellの方法⁽⁴⁸⁾に従って合成した。コレステロールは和光純薬工業より購入し精製して用いた。これらはベンゼン溶液とし -20°C で保存した。

(2) 緩衝液

中性の緩衝液はTBS (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) とPIPES 緩衝液 (145 mM NaCl, 5 mM PIPES, pH 7.4) を用いた。酸性の緩衝液はクイン酸緩衝液 (145 mM NaCl, 20-80 mM クイン酸, pH 5.0 - 6.0) を用いた。

(3) 蛋白質定量とリン定量

蛋白質の定量は Lowry らの方法⁽⁴⁹⁾とフルオレスカミンを用いた Böhlen らの方法⁽⁵⁰⁾によった。リン定量は Bartlett の方法⁽⁵¹⁾によった。

(4) ウイルス

IFV は A. PR 8 株を用いた。受精後 10 日目の鶏卵漿尿液中に接種し 36°C で 2 日間増殖させた後、岡田の方法⁽⁵²⁾で分画遠心による精製を行ない -80°C で保存した。IFV の P_C* でのラベルは前田ら⁽⁵³⁾の方法に従った。

(5) HA ロゼットと HA 再構成膜

HA ロゼットと HA 再構成膜は図 3 に示す手順で調整した。まず HA ロゼットは IFV 外膜の界面活性剤による可溶化物をショ糖密度勾配遠心に掛けることで調製した。蛋白質量

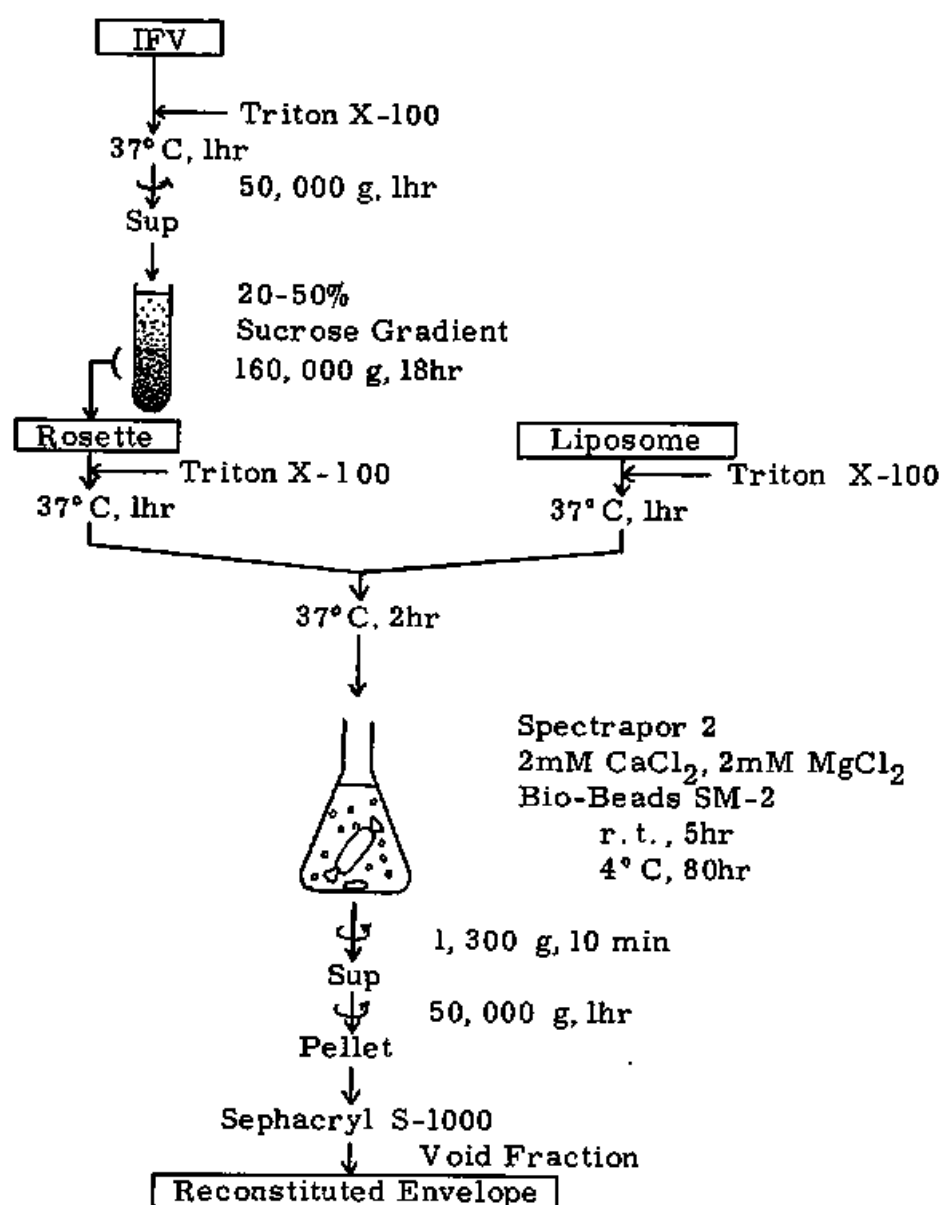


図 3.

HAロゼットとHA再構成膜の調製法の概略を示す図。

で 5 mg/ml の IFV に 20 mg/ml の Triton X-100 を加え 37°C で 1 時間処理し、 $10,000 \times g$ で 90 分間の遠心を行なった。上清に 10% のショ糖を加えて Triton X-100 を含まない 20-50% ショ糖密度勾配上に重層し、 4°C で $160,000 \times g$, 18-20 時間の遠心を行なった。チューブの底から試料の分画を行ないフルオレスカミンによって各分画の蛋白質量を定量した(図5)。蛋白質を含む 37-42% の分画を PIPES 緩衝液に対し透析し、Amicon CF 25 で濃縮したものを HAROゼットとして用いた。

HA 再構成膜の調整は Volsky と Loyter の方法⁽³⁴⁾を一部改変して行なった。 1 mg の HAROゼットあたりに 8 mg の Triton X-100 を加え 37°C で 30-60 分間処理して可溶化した。一方でフィルム状に乾固した脂質混合物(モル比で PC:PC*:コレステロール = 1.6:0.4:1)に PIPES 緩衝液を加え、ガラスビーズと共に激しく振とうして 2 mg/

ml のリポソームを調整した。これも 1 mg の脂質当たり 15 mg の Triton X-100 で 37°C, 30-60 分間処理して可溶化した。両者を P/L 比 1.4 (重量比) で混合し 37°C で 1 時間静置した後, Spectrapor membrane tubing 2 (25 mm, Spectrum Medical Industries) に入れ 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 と 3 g の Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad Laboratories) を含む 1 l の PIPES 緩衝液に対して 25°C で 4 時間, 続いて 4°C で約 80 時間の透析を行なった。1,800 × g で 15 分間の遠心での上清を 4°C で 130,000 × g, 1 時間遠心しペレットを PIPES 緩衝液に分散させた。これを Sphacryl S-500 か Sphacryl S-1000 (Pharmacia) のカラム (直径 1.1 cm, 長さ 31 cm) に通し排除体積付近の分画 (図 6 A) を 4°C で 130,000 × g, 1 時間の遠心に掛け, ペレットを PIPES 緩衝液か 145 mM NaCl に分散させ HA 再構成膜として用いた。

(6) 赤血球とゴースト

トリ赤血球とヒト赤血球は採血より1週間以内にTBSで3回洗い使用した。670×g, 10分間の遠心でのペレットを100%ヘマトクリットとした。ヒト赤血球ゴーストはSteckの方法⁽⁵⁵⁾で調製し, 元の100%ヘマトクリットと同体積になるようTBSか145 mM NaClに浮遊させ100%ゴーストとした。

(7) グリコフォリン再構成膜

グリコフォリンはSegrest⁽⁵⁶⁾の方法でヒト赤血球より抽出, 精製し -80°C で保存した。グリコフォリン再構成膜はR. I. MacDonald⁽⁵⁷⁾とR. C. MacDonaldの方法で次のように調製した。PCとコレステロール(モル比で1:1)のクロロホルム-メタノール溶液(1 mg/ml) 2 ml とグリコフォリン水溶液(0-2.5 mg₅/ml) 20₁₀ μl を混合する。窒素が

スで試料をフィルム状に乾固しさらに真空ポンプで溶媒を除く。これに1 ml のTBSと数個のガラスビーズを加え、37°Cで10分間穏やかに振とうする。微量高速遠心機で⁵ 12,000 × g, 3分間の遠心を行ない、ペレットを1 ml の145 mM NaClに分散させて実験に用いた。

(8) PC* 移行反応の測定

HA再構成膜とゴーストの膜融合は前田⁽⁵⁾の方法に従い、膜融合に伴うHA再構成膜からゴースト膜へのPC*分子の移行を測定することで調べた。HA再構成膜にはPC*が¹⁵ PCのうちの20%という高濃度で含まれているので、そのESRスペクトルはスピン-スピン交換相互作用のため広がった形になる(Exchange-broadening, 図4A)。これがゴーストと膜融合するとPC*がゴースト膜に移り膜内での濃度が希釈され、スピン-ス

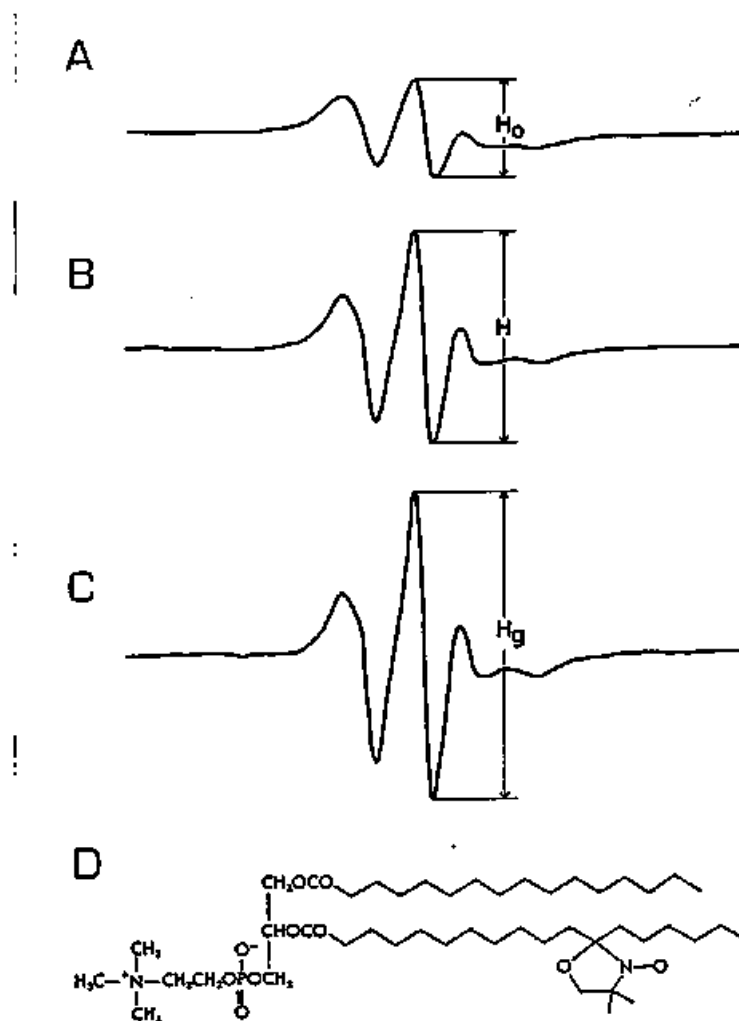


図 4.

A. PC*でスピラベルしたHA再構成膜の
ESRスペクトル。

B. HA再構成膜と赤血球ゴーストを pH 5.2,
37°Cで13分間置いた後のESRスペクトル。

C. PC*でスピラベルした赤血球ゴーストの
ESRスペクトル。

D. PC*の構造式。

ヒ⁺ン交換相互作用の解消が起こり ESR スペクトルは鋭い形に変化する (図 4 B)。PC* は HA 再構成膜に存在するかゴースト膜に存在するかの 2 つの状態しか取らないと考えられる。図 4 B の中央ピーク高 H は, HA 再構成膜の場合の中央ピーク高 H₀ (図 4 A) とゴースト膜中に PC* が存在する場合の中央ピーク高 H_g (図 4 C) の存在比を掛け合わせたものの和であると仮定して, 次式より膜融合の効率を求めた。

$$\text{膜融合の効率 (\%)} = \frac{H - H_0}{H_g - H_0} \times 100$$

なお中央ピーク高は単位 PC* 量当たりに規格化した値を用いた。PC* 量は ESR スペクトルを 2 回積分して求めた相対的なラジカル量を使用した。また H_g は, 50% ヘマトクリットの赤血球と 1 mM の PC* 超音処理小胞を TBS 中で 37°C, 10 分間静置し, 2 回 TBS で洗, たものからゴーストを調製

しそのESRスペクトルから求めた。スピンラベルしたIFVやHAロゼットとゴースト膜との反応、スピンラベルしたIFVとグリコフォリン再構成膜との反応の場合も同様の計算を行なった。ただしグリコフォリン再構成膜の場合、PCのうち2%のPC*を含むリポソーム(モル比でPC:ユレステロール=1:1)のESRスペクトルよりHgを求めた。

10 実際の測定の手順は次のように行なった。まずゴーストを用いた場合には、ウイルスやHA再構成膜、HAロゼットを4°C, 750 μ l の145 mM NaCl (NaOHでpHを7.0にしてある)中で3.3%のゴーストに5分間
15 吸着させ、250 μ l の酸性の80 mM クエン酸緩衝液を加えた後、微量高速遠心機で12,000 \times g, 30秒間の遠心を行なった。試料の温度を上げないように石英毛细管に詰め、23°Cまたは37°CでESRの測定を行なった。

グリコフォリン再構成膜を用いた場合には、

蛋白質量 $20\mu\text{g}$ のスピンドラブルした IFV と $40\mu\text{g}$ のリポソームを 4°C , $200\mu\text{l}$ の 145mM NaCl 中で 15 分間吸着させ, $12,000\times g$, 90 秒間の遠心をした。ペレットを $20\mu\text{l}$ の酸性の 20mM クエン酸緩衝液に分散させ, 温度を上げないように石英毛细管に詰め 37°C で ESR の測定を行なった。ESR は日本電子 FE-2X スペクトロメーターを使用した。

(9) 赤血球凝集と溶血

赤血球凝集価は Salk の方法によりトリ赤血球を用いて求めた。⁽⁵⁸⁾ 溶血活性はヒト赤血球から流出したヘモグロビンの吸光度の測定によって調べた。 4°C , 1ml の TBS 中で IFV や HA 再構築, HA ロゼットを 2.5% の赤血球に 15 分間吸着した後, $1,500\times g$, 5 分間の遠心をした。ペレットに 1ml の酸性の 20mM クエン酸緩衝液を加え, 37°C で

30 分間ときどきかくはんしながら反応させ、氷水中に移すと共に 4°C , 3 ml の 145 mM NaCl を加え反応を停止させた。1,500 \times g, 10 分間の遠心で得られる上清の 520 nm の吸光度を測定し、0.2% Triton X-100 を加えた際の値を 100% として溶血の効率を求めた。(中性でのヘモグロビンの吸収極大は 540 nm にあるが、酸性化によって吸収曲線が変化するので、等吸収点である 520 nm で¹⁰の吸光度を測定した。)

(10) カバーガラスのアルキル化

カバーガラスを von Tschanner と McConnell⁽⁵⁹⁾ の方法でアルキル化した。よく洗淨したカバーガラスを 70 ml ヘキサデカン, 15 ml 四塩化炭素, 7.5 ml クロロホルム, 1 ml オクタデシルトリクロロシランの混合液の中に入れ、かくはんしながら 1 晩反応させた。クロロホルム中とエタノール中での超音波処理

による洗浄を3回繰り返し、 $110-150^{\circ}\text{C}$ で乾燥させた。

(11) 電子顕微鏡による観察

ネガティブ染色像は、 KOH で pH を7.4にした3%リンタングステン酸で試料を染色し、日本電子 Model 100B 電子顕微鏡で観察した。フリーズ・フラクチャー像は次のようにして観察した。IFVやHA再構成膜を $130,000\times g$ で1時間遠心し、得られたペレット上に2.5%グルタルアルデヒドを含む pH 7.4の0.1Mカコジル酸緩衝液を加え、 4°C で1日静置して固定をした。次に緩衝液を30%グリセロールを含む0.1Mカコジル酸緩衝液に換えて一晩静置した。試料を液体窒素で冷却したFreon 22で凍結し、液体窒素中に移した。これをBalzersのフリーズ・エッチングユニット (Model BAF 400) によって -115°C で割り、白金のレプリカを調製

た。観察は日立 Model HU-12A 電子顕微鏡
で行なった。

5

10

15

4. 結果

(1) HAロゼットとHA再構成膜の調製

IFVのTriton X-100による可溶化物のショ糖密度勾配遠心によって、再現性良く35-42%の部分に蛋白質の分画を得た(図5A)。10.5% SDS-PAGE⁽⁶⁰⁾によるとこの分画のほとんどはHA₁とHA₂であり、NAやNPは微量しかみられなかった。またMは全く検出できなかった。リン脂質の混在はHA 1分子当たり2分子以下であり、3H-Triton X-100を用いた実験よりTriton X-100の残存はHA 1分子当たり10分子以下であった。この分画をリンタンゲステン酸でネガティブ染色した電子顕微鏡観察像は長さ10-15 nmのスパイクが数個金米糖状か刷毛状に会合したものであった(図5B)。このHAロゼットはその形態や少ない脂質含

からは脂質二分子層を持つとは考えにくく、HAが本来は外膜の脂質二分子層中に埋め込んでいる疎水性部分でお互いに会合体を形成したものだと考えられる。

HAロゼットは後述するように赤血球凝集活性と酸性での溶血活性などを持つので、その意味でウイルス外膜のモデル系の1つであり、HAと生体膜との相互作用の研究に利用できる^(38,40)。しかしHAを保持する膜構造を持たない¹⁰ので、外膜融合そのものの解析には使えない。ここではこれをHAの抽出試料として用いることにして、脂質二分子層に埋め込むことを試た。

HAロゼットとりボソーム（モル比でPC:ユレステロール=2:1を含む）のTriton X-100による可溶化物をP/L比1.4:1（重量比）で混合し透析をした。これを遠心したペレットのネガティブ染色像には、直径100nmから数百nmまでのウイルスと同程度か数倍の大きさを持つ小胞と、それには取

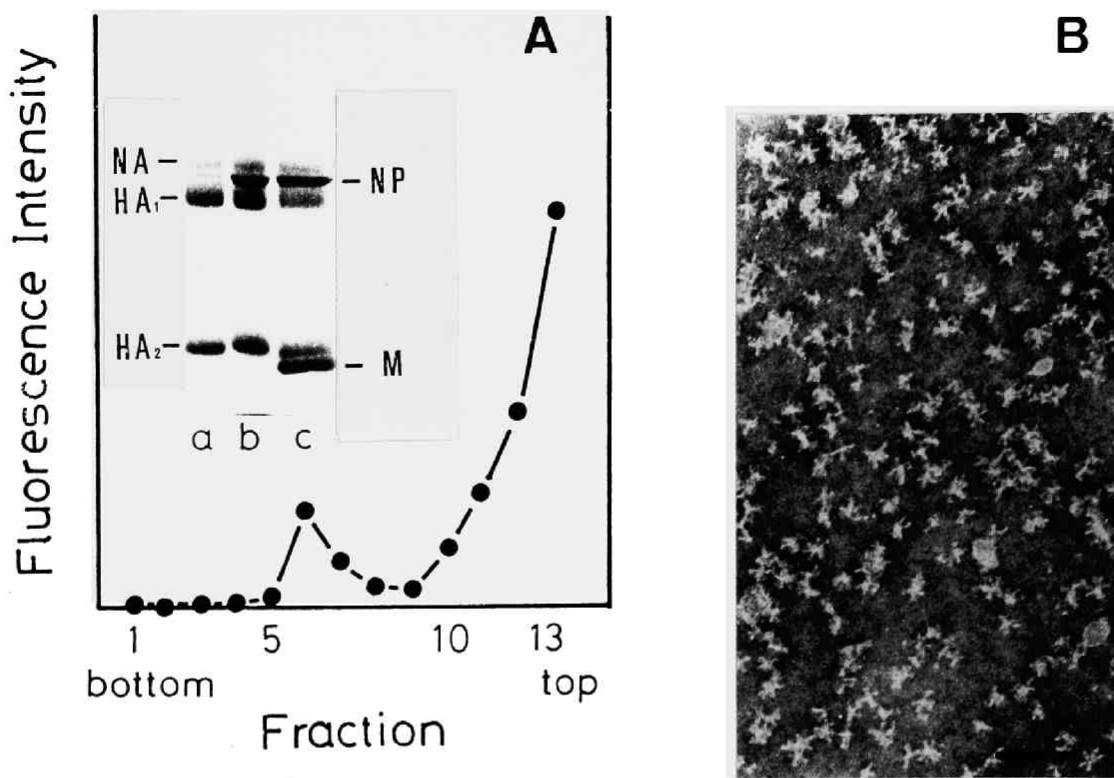


図 5.

A. IFVのTriton X-100による可溶化物をショ糖密度勾配遠心法によって分画した。たて軸は各分画に加えたフルオレスカミンの蛍光強度。
(挿入図) a: 6, 7番目の分画, b: Triton X-100による可溶化物, c: IFVのSDS-PAGEの結果。

B. HAロゼット(6, 7番目の分画)のネガティブ染色像。(Bar = 100 nm)

り込まれなかったHAロゼットがみられた(図7A)。HAロゼットの混在はHA再構成小胞の諸活性の解析にとって不都合であるので、Sphacryl S-1000のカラムを通過させることで両者の分離を行なった(図6A)。排除体積付近の分画にはP/L比が0.71:1のHA再構成小胞が溶出され(図7B)、それに続く広い分画にHAロゼットが溶出された(図7C)。またショ糖密度勾配遠心で調整したHAロゼットだけを同じカラムに通すと、これも排除体積よりあとの広い分画に溶出された(図6B)。

HA再構成小胞の輪郭の部分には、元のIFVと同様に長さ10-15nmのスパイク構造が並んでいる様子が観察される(図7B, 基礎となる論文2の図1B)。リンタングステン酸が内部まで浸透したと思われる部分では腹の両側からスパイクが突出していることが解る。また小胞の表面部分にはスパイクを上側から投影した像だと思われる直径数nm

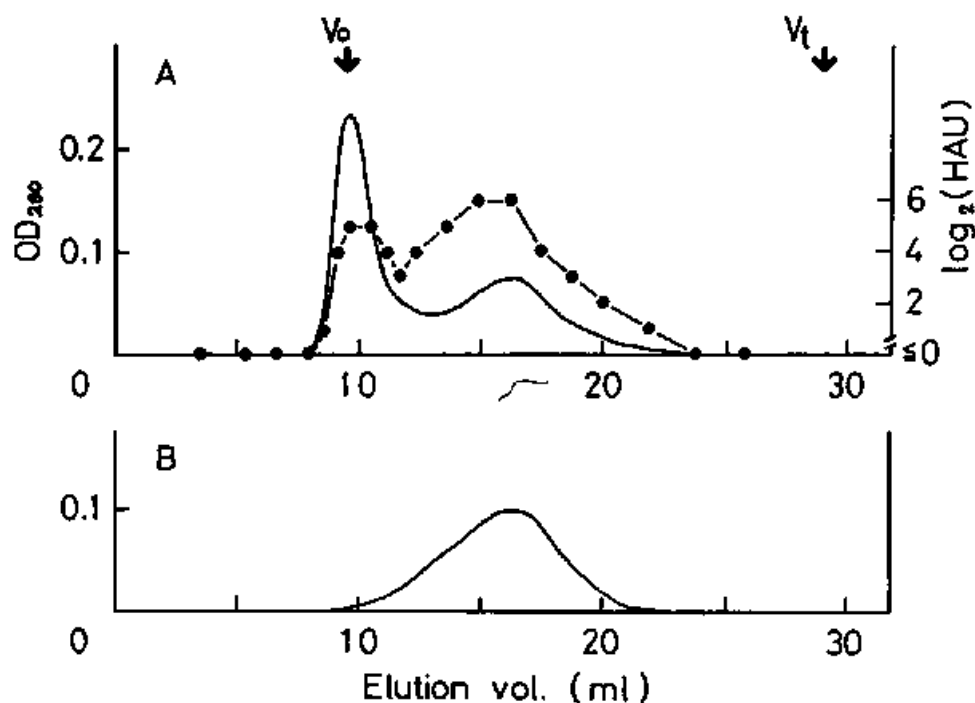


図 6.

A. 透析後の試料をセファクリル S-1000 のカラムを通過させたときの溶出パターン。黒丸は各分画の 1 ml 当たりの赤血球凝集価を示す。V₀ = *E. coli* によって調べた排除体積。V_t = カラム総体積。

B. HA ロゼットを A と同じカラムに通したときの溶出パターン。

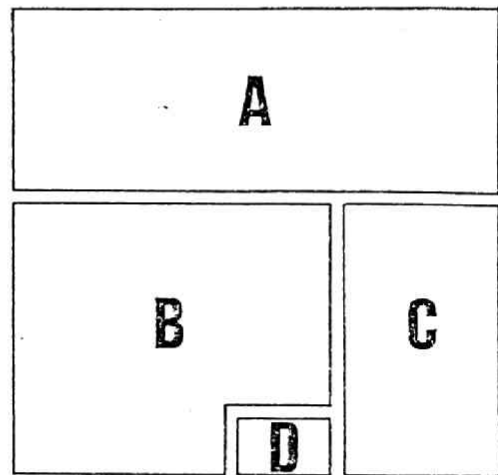
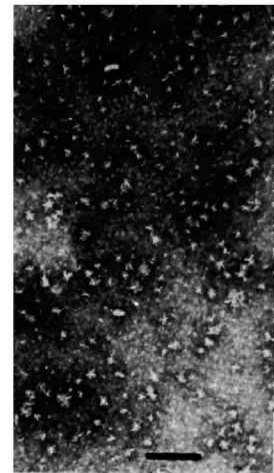
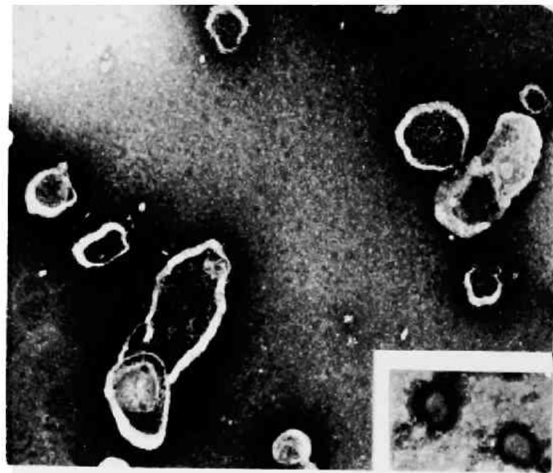
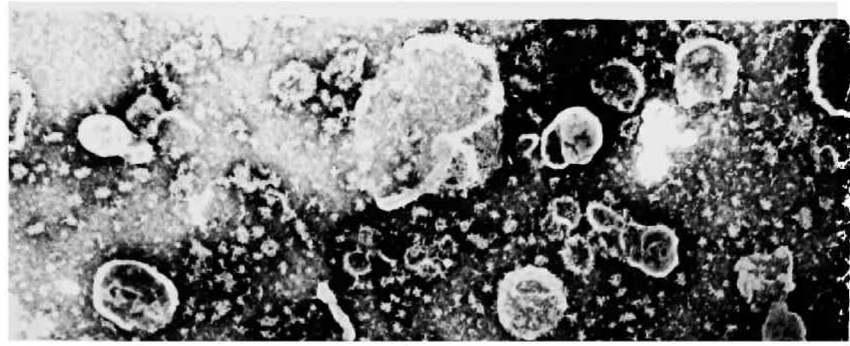


図 7.

透析後の生成物のネガティブ染色電子顕微鏡像。

A. S-1000 カラムを通す前の試料。

B. S-1000 カラムの排除体積付近の分画。

C. S-1000 カラムの第2の分画。

D. IFV。 (Bar = 200 nm)

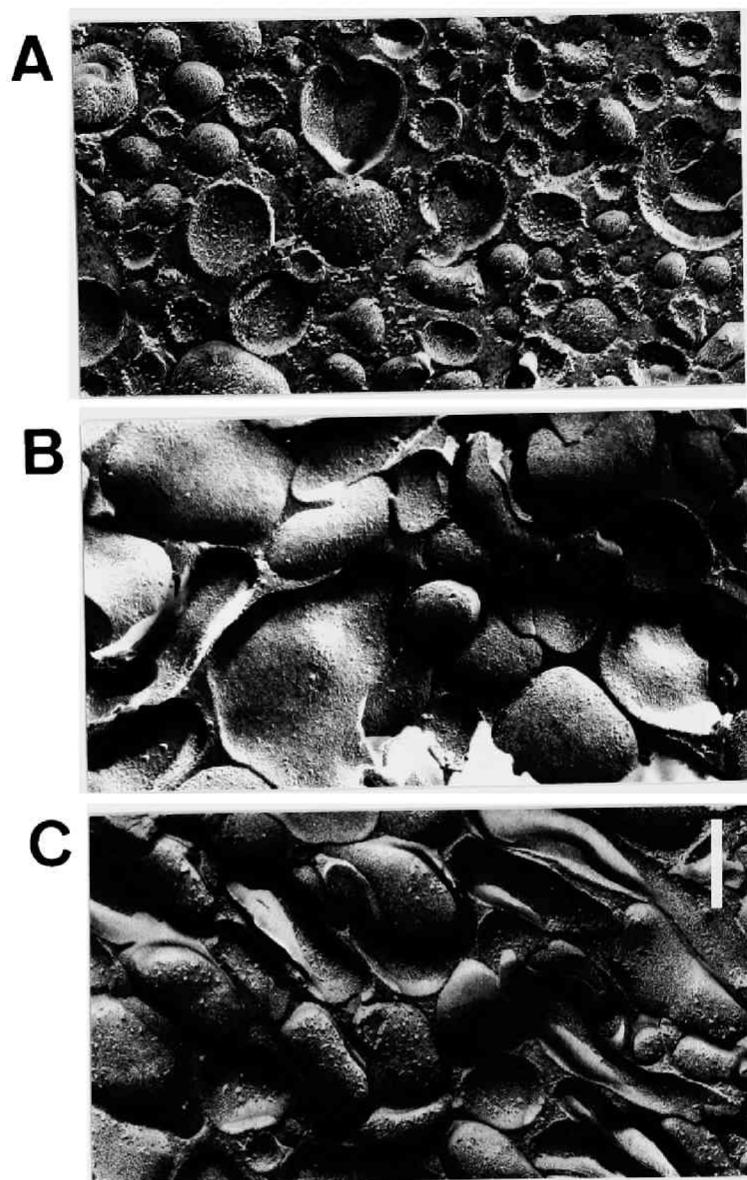


図 8、

フリーズフラクチャー電子顕微鏡像。

A. IFV。

B. HA再構成膜。

C. Bを酸性処理(pH 5.2, 0°C, 5分間)した場合。

(Bar = 200 nm)

の斑点が散在している。このことからHAは膜に対称的に埋め込まれ小胞の膜全体に一樣に分布していると考えられる。

フリーズ・フラクチャー法による断面を⁵観察すると、IFVの場合には凸面よりも凹面に膜内粒子 (IMP) が多い (図8A) のに対し、HA再構成膜では凹面にも凸面にもほぼ同頻度でIMPが存在した (図8B)。また断面の周辺は一筋の輪郭線で縁取られて¹⁰おり、脂質の外層を示す階段状の輪郭部分はまれにしか観察されなかった。この結果からもHAは膜内在性蛋白質として脂質二分子層1枚からなる小胞膜中に、膜の両側から埋め込まれたと考えられる。このHA再構成膜¹³を酸性処理してもIMPの凝集などの著しい変化はみられなかったが、IMPの輪郭がより明瞭に観察される傾向があった (図8C)。

(2) HA再構成膜と赤血球の反応

序論で述べたように、HAは1つの蛋白質でありながら細胞表面の受容体への結合と外膜融合の誘導という2つの機能を持ち備えている。この2つの機能を試験管内で高感度⁵にしかも容易に検出する方法として、種々のウイルスと赤血球の反応が常套手段のように用いられてきた。⁽⁶⁾第1の機能の検出は赤血球凝集反応による。ウイルス外膜のスパイクが赤血球表面の受容体に結合すると、ウイルス粒子が赤血球どうしを架橋し赤血球の大きな凝集塊を形成する。この反応を利用してHAと受容体の結合の量の目安が得られる。第2の機能の検出は溶血反応と細胞融合による。ウイルスが赤血球と外膜融合をすると、赤血球¹⁰膜に何らかの損傷が生じ細胞質が流出する。これは外膜融合を間接的に反映する反応であると考えられている。また溶血に伴って赤血球どうしの細胞融合が起こり、いくつかの赤血球から大型の細胞が形成される。これは1つのウイルス粒子が同時に¹⁵か、或いは連続して

かして2つの赤血球と外膜融合することによって生じると考えられ、やはり外膜融合の間接的証拠として用いられている。

IFVが持っている赤血球凝集活性やpH依存性の溶血活性と細胞融合活性が、前節で調製したHA再構成膜にも保持されているかを検討した。図9にIFV, HAロゼット, HA再構成膜の各試料をヒト赤血球に吸着させた後、pH 5.2, 37°Cで30分間静置した結果を示す。どの場合にも赤血球凝集と溶血が観察された(未溶血の赤血球は輝いて見える。図中矢印)。しかしIFVとHA再構成膜では細胞融合が生じたのに対し、HAロゼットでは全く見られなかった。またBHAでは赤血球凝集, 溶血, 細胞融合のいずれも認められなかった(基礎となる論文1)。各試料のいくつかの性状を表1にまとめた。

IFVについての赤血球凝集価は、HAが全ウイルス蛋白質の40%を占める⁽⁶²⁾として、1mgのHA当たりの値に換算すると約

	Protein/Lipid by weight	Diameter (nm)	HAU/ mg protein	Hemolysis	Cell fusion
IFV	3.3 (1.3)	60-150	93,000 (230,000)	+	++
HA rosette	>5,000	20- 30	190,000	+	
HA reconstituted vesicles	0.71	100-600	230,000	+	+

表 1.

IFVとHAロゼットとHA再構成膜の性状の比較。(P/L比は重量比。IFVのカッコ内の値はウイルス蛋白質量の40%がHA⁽⁶²⁾だとして計算した。)

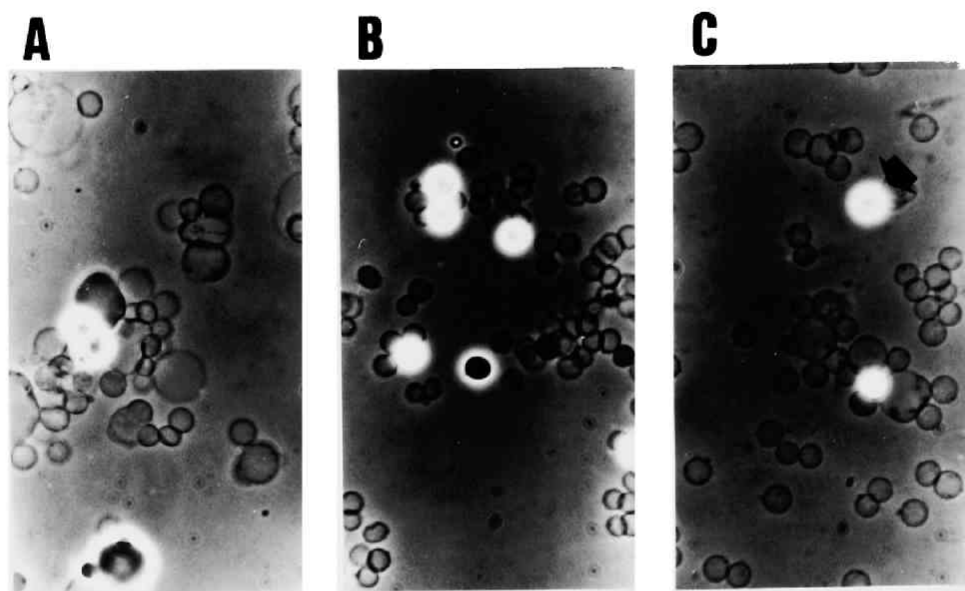


図 9.

A. IFV (蛋白質濃度 $16 \mu\text{g/ml}$) を 2.5% ヒト赤血球と pH 5.2, 37°C で 30 分間反応させた後の位相差顕微鏡写真。

B. HA口ゼット ($3 \mu\text{g/ml}$) の場合。

C. HA再構成膜 ($7 \mu\text{g/ml}$) の場合。

230,000 HAUであり、3試料とも同程度の赤血球凝集活性を持つと見なせる。溶血はどの試料も pH 6 以下の酸性に限って強い活性が見られ、pH 依存性は全く同じであつた（図 10）。図 11 に各試料の溶血活性の濃度依存性を示す。IFV 蛋白質の 40% が HA であることを考慮に入れても、HA ロゼットや HA 再構成膜が IFV と同等かそれ以上の強い溶血活性を持つことが解る。

(3) HA 再構成膜と赤血球ゴーストの膜融合

前節の結果より HA 再構成膜が元の IFV と同様に、赤血球と pH 依存性の膜融合を起こしていることが示唆された。しかしウイルスによる溶血や赤血球細胞融合がウイルス外膜や小胞の融合を間接的に反映しているとは言、ても、必ずしもその因果関係がはっきりしているわけではない。そこで赤血球膜との

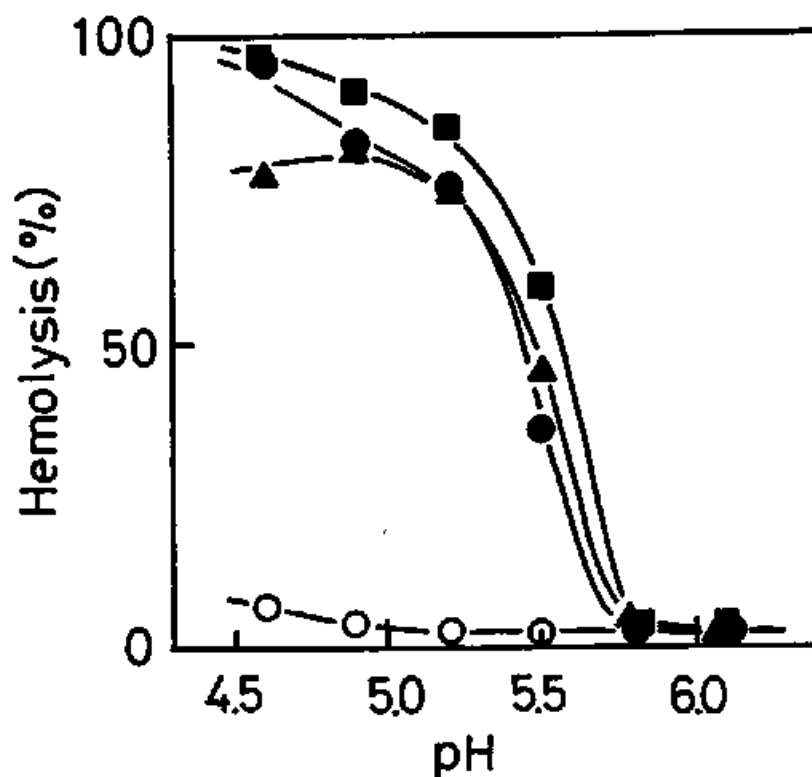


図 10.

溶血の pH 依存性

● IFV (蛋白質濃度 16 $\mu\text{g/ml}$) を 2.5% ヒト赤血球と各 pH, 37°C で 30 分間反応させた。

▲ HA 再構成膜 (7 $\mu\text{g/ml}$) の場合。

■ HA ロゼット (3 $\mu\text{g/ml}$) の場合。

○ 自然溶血。

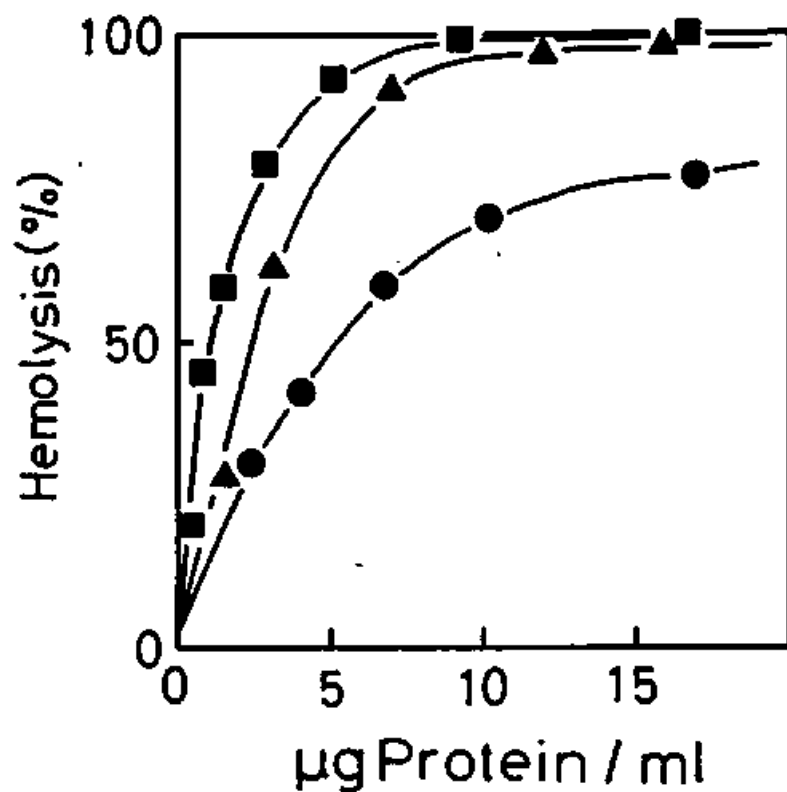


図 11.

● IFVによる2.5%ヒト赤血球の溶血 (pH 5.2, 37°C, 30分間後)の濃度依存性。

▲ HA再構成膜。

■ HAロゼット。

膜融合反応をスピンドラベル法によって検討した。この方法は両方の膜の構成分子の混合という膜融合と直接結びついた現象を利用して、定量的な測定を経時的に行なうことができるので、今の目的に最も有効である。但し、この方法を適用する際には、膜融合とは無関係な脂質分子の移行反応が生じないことを保証しておかななくてはならない。実際、ヒト赤血球の細胞質中には高い活性を持つリン脂質交換蛋白質が存在する⁽⁶³⁾ので、ウイルスや再構成小胞が赤血球と膜融合し溶血が生じると、この交換蛋白質によるPC*の移行が開始されてしまう。本研究ではこれを避けるために、赤血球の細胞膜だけの標本である赤血球ゴーストを調製し、IFVやHA再構成膜の膜融合の相手として使用した。

1節で調製したHA再構成膜をゴーストに吸着させpH 5.2の緩衝液中に移すと、すみやかにESRスペクトルの変化が開始され、23°Cでは5分以内に(図12), 37°Cで

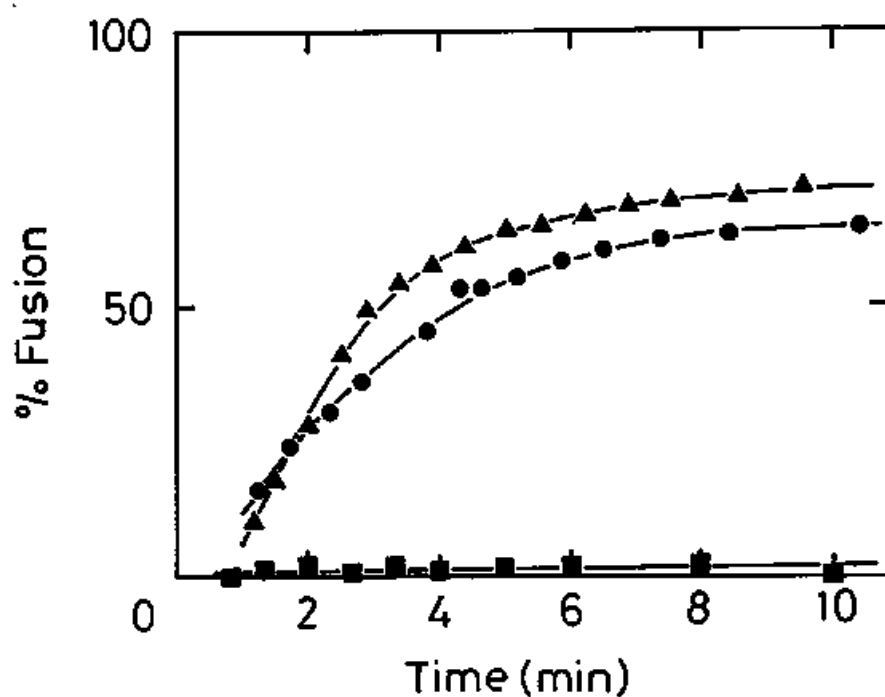


図 12.

● PC^* の移行反応によつて調べた IFV と赤血球
ゴーストの膜融合 ($pH\ 5.2$, $23^\circ C$)。

▲ HA 再構成膜と赤血球ゴーストの膜融合。

■ HA ロゼットから赤血球ゴーストへの PC^* の移行。

は2分以内に(図14)ほぼ完結した。5分後の膜融合効率は71%であった。これはIFV外膜とゴーストとの時間依存性や効率(5分後で64%)とよく一致している(図12)。⁵ HA再構成膜を調製した際に同時にHAロゼットが形成されたが(図6Aの第2の分画, 図7C), これにもPC*が取り込まれていた。この試料を用いてHAロゼットからゴーストへの酸性でのPC*の移行反応を検討したが、¹⁰ 5分後の効率は2%以下という低い値であった(図12)。HA再構成膜とゴーストの膜融合はpH6より酸性側に限って生じた(図13)。このpH依存性はこの再構成膜による溶血ばかりでなく、IFVによる溶血や外膜融合、¹⁵ HAロゼットによる溶血とも一致した。

(4) P/L比とコレステロール含量

序論で述べたように、IFVの外膜融合の

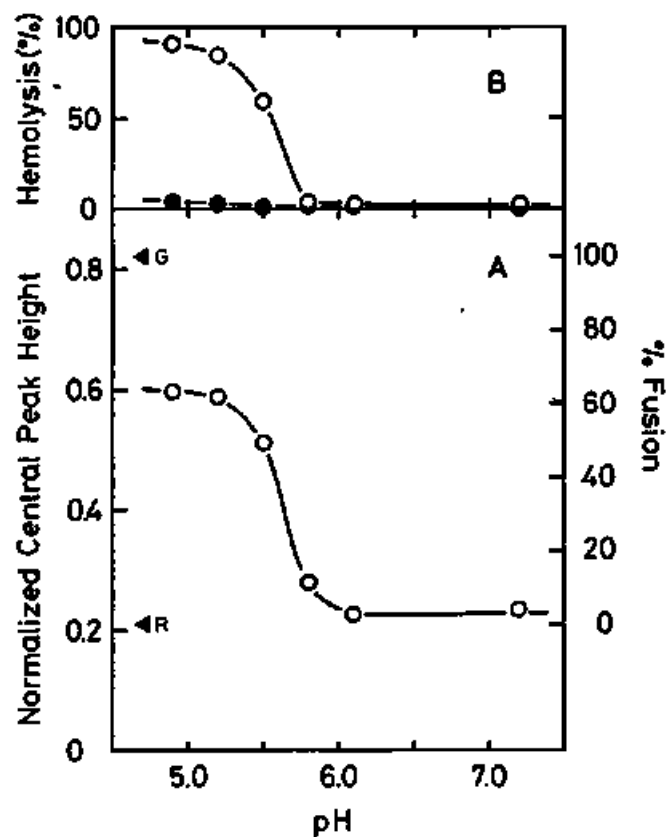


図 13.

A. PC*の移行反応で調べたHA再構成膜と赤血球
ゴーストの膜融合のpH依存性。(R; HA再構
成膜の中央ピーク高, G; ゴーストの中央ピーク
高)

B. ○ HA再構成膜による溶血。

● 自然溶血。

相手となる膜の組成や物理的状态に関する研究が報告されている一方で、IFV外膜側の膜融合に必要な組成についてはほとんど何も解っていない。HA再構成膜をP/L比とコレステロール含量を変えて調製し、その膜融合活性を調べることによって、この問題の解明に着手した。

まず表2に示すような5通りのP/L混合比でTriton X-100の透析、ゲル濾過を行なうと、その混合比を反映したHA再構成膜が調製された。ネガティブ染色像はどの試料も表面にスパイクを持つ小胞構造を示した。P/L比が小さくなるにつれ小胞の直径が増大し（試料Aでは100nm程であるのに対し試料Eでは数百nmの小胞が得られた。）、表面のスパイク密度が小さくなる傾向にあった。試料B-EについてpH 5.2, 37°Cでのゴーストとの膜融合を調べた結果を図14に示す。どのHA再構成膜も2分以内に反応を完結した。しかし5分後の膜融合の効率にはP/L

2)

Protein/phospholipid /cholesterol (protein/phospholipid molar ratio)		Hemagglutination unit per mg protein	Normalized ESR peak height	Fusion efficiency (%)
Preparation mixture	Reconstituted vesicles			
(A) 1:11	1:31			
(B) 1:29	1:69	53000	0.26	66
(C) 1:70	1:120	87000	0.21	63
(D) 1:180	1:190	27000	0.18	40
(E) 1:450	1:410	91000	0.14	17

表 2.

P/L 比を変えて調製したHA再構成膜の性状。

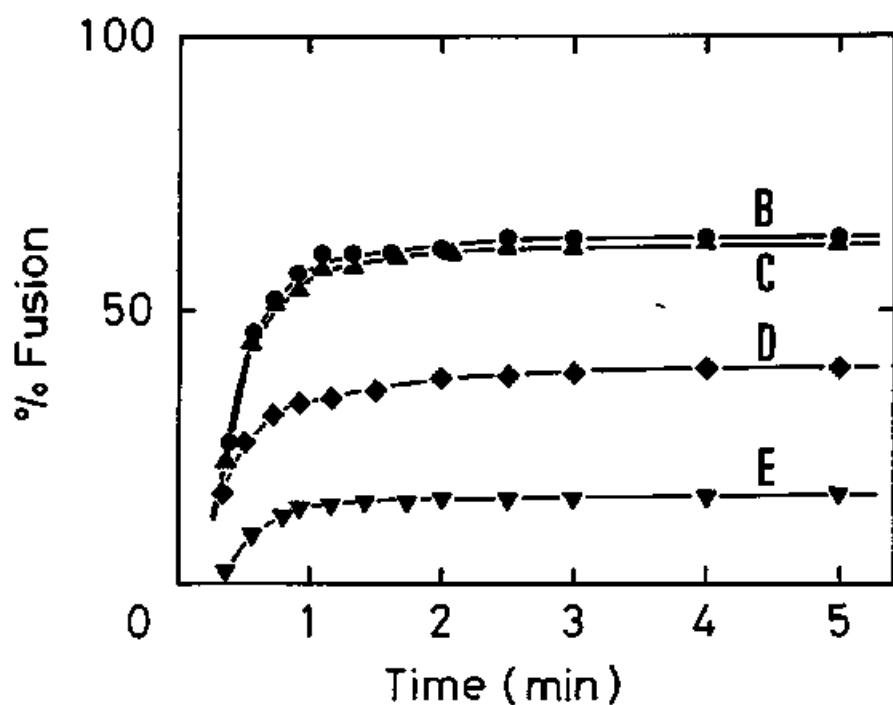


図 14.

P/L 比を変えて調製した HA 再構成膜の赤血球グ
ーストとの膜融合 (pH 5.2, 37°C)。記号は表 2
と同じ。

L比が高い程良く、試料Bでは66%の効率
であつたのに対し、試料Eではわずか17%
の膜融合しかみられなかつた(図14, 表2
)。

次にP/L比を一定(重量比で1.4:1)
にして、PCに対するコレステロールのモル
比を1:1(試料F), 1:0.75(G),
1:0.5(H), 1:0.25(I), 1:0
(J)の5通りに変えてTriton X-100の
透析を行なつた。各試料をSephacryl S-
1000カラムに通すと、溶出パターンに顕著
な差が表れた(図15)。コレステロールを
含まない試料JではHAロゼットの分画のみ
が存在し、排除体積付近の小胞の分画はほと
んど認められなかつた。試料IからFへコレ
ステロール含量を増加させてゆくと、HAロ
ゼットの分画がしだいに減少する一方で小胞
の分画が増加した。F-Iの4つの試料の小
胞の分画についてpH 5.2, 23°Cでのゴー
ストとの膜融合を調べた(図16)。どの場

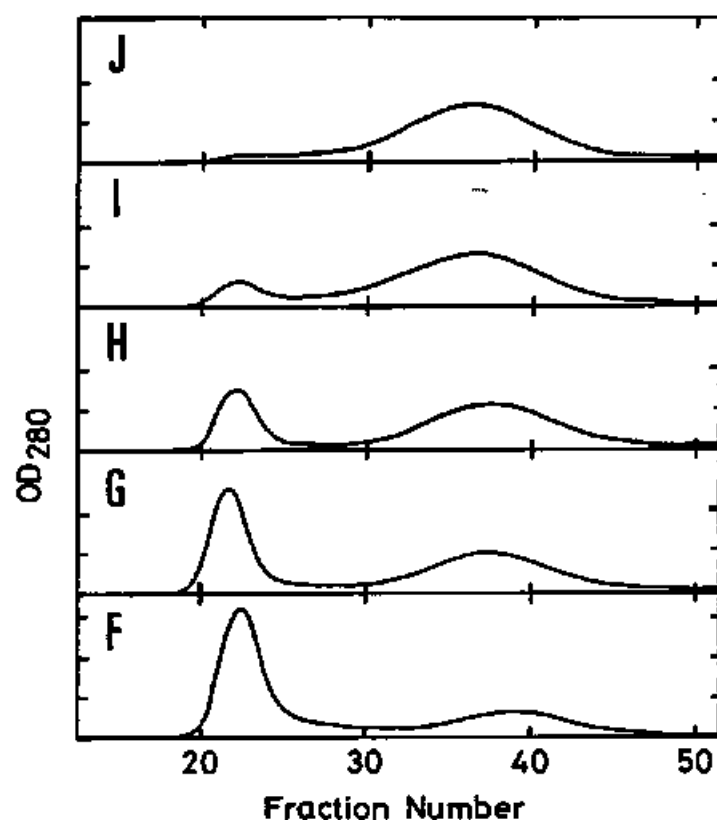


図 15.

コレステロール含量を変えて Triton X-100 を透析した後 S-1000 カラムを通したときの溶出パターン。

F; モル比で PC:コレステロール = 1:1,

G; 1:0.75, H; 1:0.5, I; 1:0.25,

J; 1:0。

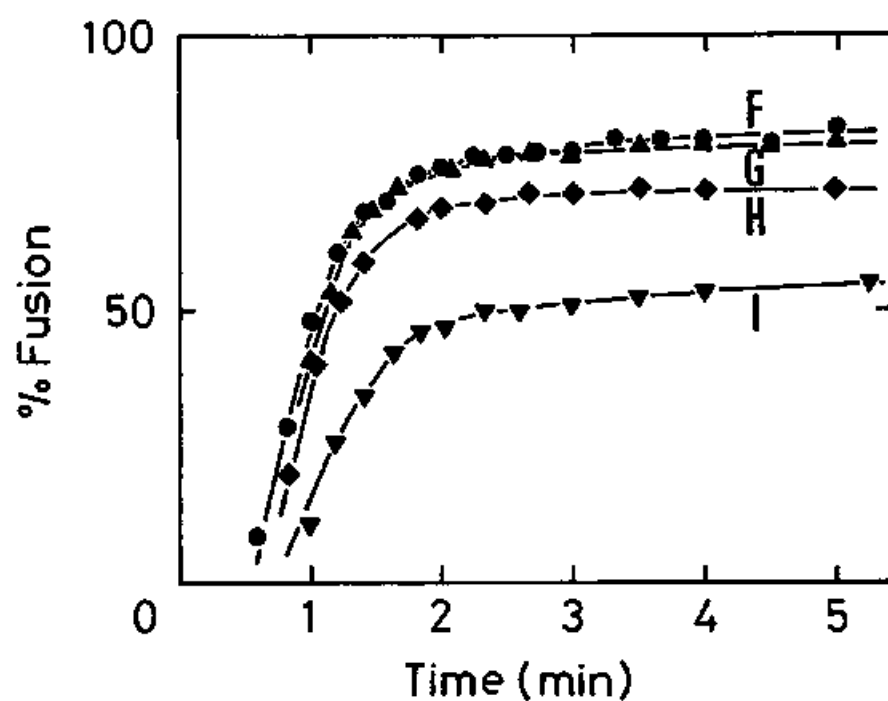


図 16.

コレステロール含量を変えて調製したHA再構成膜
と赤血球ゴーストの膜融合反応 (pH 5.2, 23°C)。
記号は図15と同じ。

合もすみやかに反応が起こり3分以内に完結した。5分後の膜融合の効率を比較すると、コレステロール含量が高い方が効率が高かった。試料Iでは53%であつたのに対して、試料Fでは元のIFV(64%)を上まゐる80%の高率で膜融合を起こした。

(5) アルキル化したガラス表面上へのHAの再構成

HAが外膜上でどのような動的状態(側方拡散や膜面に垂直な方向での回転運動)にあり、酸性化によつてこれがどのように変化するかは、HAの引き起こす膜融合の機構を考える上で興味深い問題である。HAに蛍光ラベルを導入すれば、側方拡散は蛍光退色回復法によつて、回転運動は蛍光偏光解消法によつて測定が可能になる。しかし前節までで取り扱つたHA再構成小胞は、2つの理由によつてこれらの研究には利用できない。1つは、

小胞の数百 nm の直径では蛍光退色回復法（少なくとも直径数 μm が必要。）には小さ過ぎることである。2 つ目は，IFV や HA ロゼットとして BHA はそれだけを酸性下に晒すと自己凝集を起こしてしまうので，HA 再構成小胞も酸性では凝集塊を形成すると考えられることである。石黒と中西はアルキル化したカバーガラスを支持体とした脂質単分子層に内在性蛋白質であるグリコフォリンを再構成している。HA についてもこの系を利用すれば、十分な観察面積が得られる上に膜どうしの凝集の心配も無いので、顕微鏡下での蛍光分光法が可能になり上述の問題に取り組むことができる。

オクタデシルトリクロロシランでアルキル化したカバーガラスを，HA，PC，コレステロール，Triton X-100 の混合物（重量比で P/L 比 1:1，PC:コレステロール = 2:1）と共に透析チューブの中に入れた。透析で Triton X-100 を除いた後，カバー

グラスを取り出しTBSを滴下したスライド
グラス上に移した。このとき端を両面テープ
で支えガラス間の隙間を確保した。カバーグ
ラスの横からTBSによる洗浄を行なった後、
5 0.5%ヘマトクリットのヒト赤血球を加え、
カバーグラスを下にして室温で15分間静置
した。今度はスライドグラスを下にして位相
差顕微鏡のステージに移し、カバーグラスの
下面に焦点を合わせると、重力に逆って赤血
10 球が吸着している様子が観察された(図17
A)。次に、カバーグラスの横から緩衝液を
pH 5.2のものに入れ換え37°Cで30分間
静置すると、吸着していた赤血球の大半が溶
血した(図17B)。この結果はHAが2つ
15 の活性を保持したまま、カバーグラス上に再
構成されたことを示すと考えられる。

(6) IFVとグリコフォリン再構成膜の 膜融合

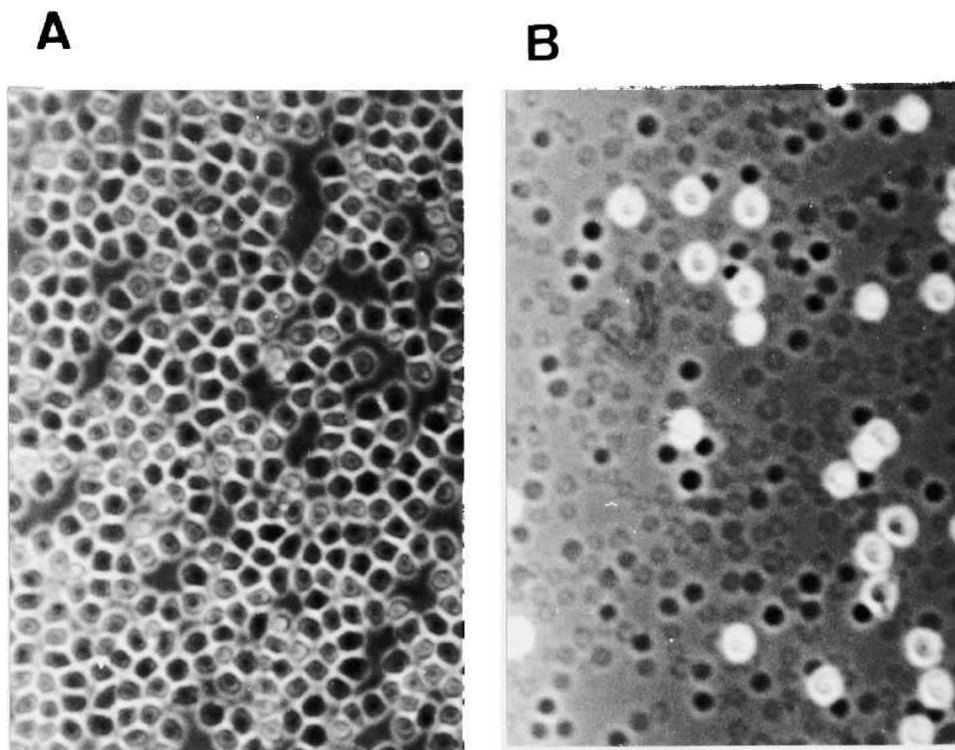


図 17.

A. アルキル化したカバーガラス上のHA再構成膜
へのヒト赤血球の吸着。

B. AをpH 5.2, 37°Cで30分間処理した。

IFVの受容体が末端にシアル酸を持つ糖鎖であることは、赤血球をシアリダーゼ処理すると赤血球凝集が起⁽²⁴⁾こらないことから古くより知られている。ところが前田らは、IFVがウイルス受容体を含まないリン脂質のみからなるリポソームと膜融合を起こすことを報告し、相手の膜の脂質層がHAスパイクの相互作用する部位であることを明らかにしている。この2つのことを並べてみると、受容体は外膜融合の際にどのような役割を持つのかということが問題になる。これを解明するためにPCとコレステロール(モル比で1:1)よりなるリポソームに、ヒト赤血球から抽出、精製したグリコフォリンをIFV受容体として再構成した。そしてこの受容体が外膜融合に与える影響を、スペンラベルを施したIFVとの反応を調べることによ、て検討した。

IFVはグリコフォリン再構成膜と、pHに依存した膜融合を生じた(図18)。この効

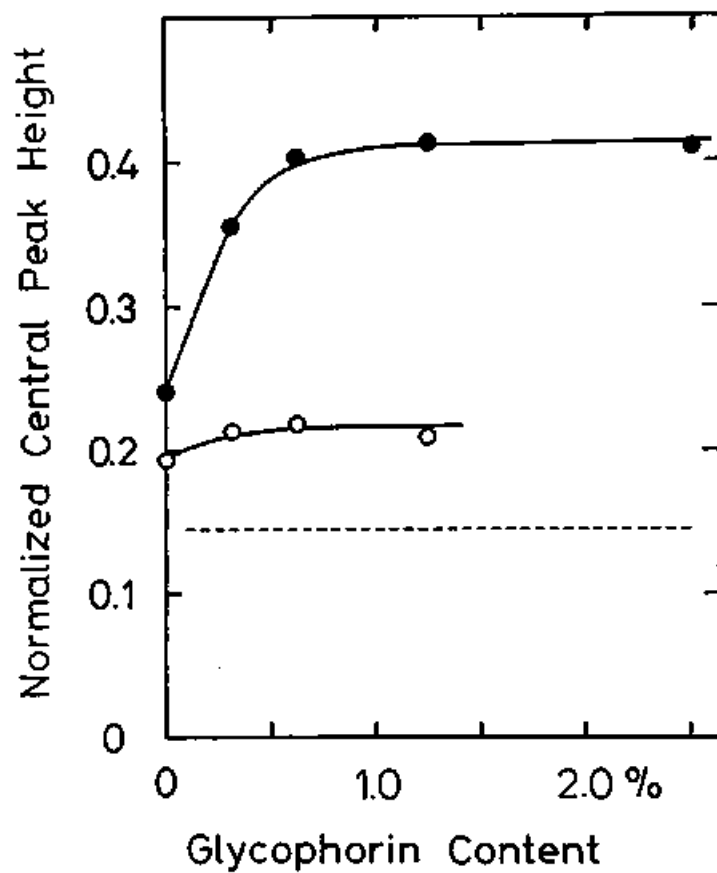


図 18.

グリコフォリン含量を変えて調製したグリコフォリン再構成膜とIFVの膜融合。● pH 5.2, 37°C, 5分後。○ pH 7.4, 37°C, 5分後。点線はIFVの中央ピーク高。

率はグリコフォリンを含まない場合より高く、グリコフォリン含量が多い程効率も高かった。グリコフォリンを含む場合も含まない場合も、この反応は $\text{pH } 5.2$, 37°C ですみやかに進み、ゴーストの場合と同様に2分以内で完結した(図19)。PC*をPCのうち2%含むリポソームのESRスペクトルを、100%のEFVが膜融合を生じた場合のモデルスペクトルとして採用し、外膜融合の効率を見積らった。その結果はグリコフォリンを含まない場合には10%であったが、グリコフォリンをリポソームの脂質重量の0.6%以上含む場合には45%であった。

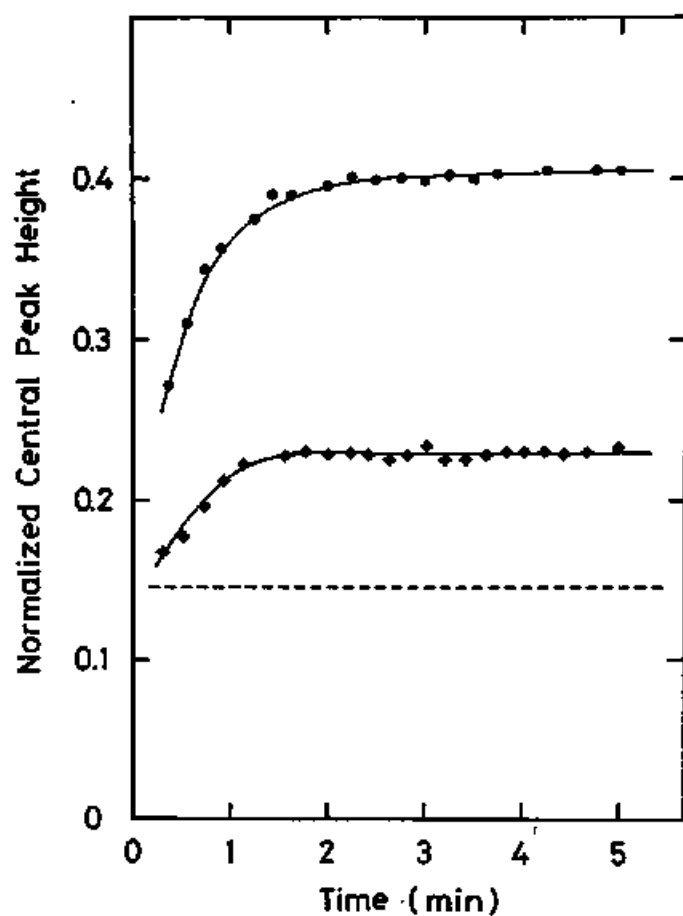


図 19.

● 0.6%のグリコフォリンを含むグリコフォリン再構成

膜（モル比でPC:エステロール=1:1）と

IFVのpH 5.2, 37°Cでの膜融合の進行。

◆ グリコフォリンを含まない場合。

5. 考 察

本研究は、HAをPCとコレステロールだけを含む脂質層に内在性蛋白質として再構成し、IFV外膜と全く同じpH依存性の強い膜融合活性を再現した。これには高いP/L比（重量比で約1:1以上）とコレステロール含量（約30 mol%以上）が必要であった。適当な組成で調製したHA再構成膜は、元のIFVと同等の赤血球凝集、pH依存性の溶血を生じた。スピンラベル法によって赤血球ゴーストとの膜融合反応を調べても、元のIFVと同様のpH依存性と大きな速度で、効率の良い活性があることが明瞭に示された。

IFVの外膜にはHAのほかにNAとMの2種類の蛋白質が存在するが、上の結果は細胞への吸着にも、外膜融合にもHAだけが必要であることを示している。細胞侵入過程で働くウイルス側の因子はHAだけであることが

(65)

改めて確認された。Klenk らによれば IFV の外膜の脂質層は、リン脂質 52 % , 糖脂質 10 % , トリグリセリド 5.0 % , コレステロール 19.3 % , コレステロールエステル 0.3 % (重量比) を含んでいる。そしてリン脂質の内訳は、スフィンゴミエリン 35.4 % , PC 23.7 % , ホスファチジルイノシトール 5.4 % , ホスファチジルセリン (PS) 9.2 % , ホスファチジエタノールアミン (PE) 26.3 % (重量比) である。しかし本研究で用いた脂質は PC とコレステロールだけなので、HA が外膜融合を生じる際にはこれ以外の特別な脂質 (PS や PE など) は必要でないことが解る。IFV とリポソームの膜融合を調べた研究から、相手側の膜にも特別な脂質要求性が無いことが解っているので、HA はどのような脂質組成を持つ 2 つの膜をも融合に導くことができることになる。つまり、どんな脂質組成の細胞膜から出身し形成された IFV でも、どんな脂質組成のエンドゾー

膜とも外膜融合を生じることができると考えられる。

ただし唯一の例外は外膜中のコレステロールの必要性である。コレステロール含量が多いHA再構成膜程、膜融合の活性が高かった。コレステロールが脂質分子の50%を占める場合には約80%のHA再構成膜がゴーストと膜融合を起こした。上述のKlenkらの報告では外膜のコレステロールは脂質重量の19.3%を占め、リン脂質に対するモル比は0.73である。このコレステロールがHAと何らかの相互作用を持ち、外膜融合に関与していると思われる。

コレステロールのもう一つの重要性は、HAを小胞上に再構成するためにコレステロールが不可欠であることである。PCだけでコレステロールを含まない場合には、HAロゼットだけが形成され小胞は形成されなかった。小沢と浅野はセンダイウイルスのスパイク蛋白質であるHNとFを精製し、PC、

PE, PS, スフィンゴミエリン, コレステ
ロールを含む脂質混合物を用いて, 溶血活性
と細胞融合活性を持つ再構成膜を調製してい
る。⁽⁶⁶⁾ 彼らの研究でもコレステロールを含まな
い場合には、溶血は生じるが細胞融合は観察
されていない。この場合も、HNとFから口
ゼット状の会合体が形成されたのだと思われ
る。⁽⁶⁷⁾ Presticらは、水素結合と疎水的相互作
用によつてリン脂質とコレステロールが1:1
の複合体を形成していると提唱している。膜
蛋白質と脂質と界面活性剤から構成されたミ
セルから膜構造への移行に、このような複合
体が必要であるのかもしれない。

P/L比を変えて表面のスパイク密度の異
なるHA再構成膜を調製した。ゴーストとの
膜融合活性はこのスパイク密度が高い程大き
かった。これについて2通りの解釈が成り立つ。
①HAは三量体のスパイク1本で外膜融合を
引き起こす。しかし受容体に結合したスパイ
クが酸性で構造変化を起こすとき、そのうち

の一部がある確率に従って相手の膜に作用するので、スパイク密度が高い程膜融合が起こりやすい。②HAスパイクは複数個が同時に作用することによつて外膜融合を生じる。スパイク密度が高い程、反応に必要な一定数以上のスパイクが同時に構造変化を起こす頻度が増加するので、膜融合の効率が高くなる。最初の解釈に従えば、スパイク密度が低くまたスパイクの作用の確率が低い場合でも、充分な時間が経過する間には膜融合が生じてくるはずであるが、そのような小さな反応速度による膜融合は見られなかった(図14)。またBHAをリポソーム共存下で酸性にすると、ほぼすべてのBHAがリポソームへの吸着⁽¹⁾を起こすことが報告されているので、ゴースト表面に結合しているHAも高い確率でゴースト膜に作用を及ぼすことが期待される。したがって1番目の解釈は考えにくく、2番目の解釈が有力であると思われる。同時的な作用としては、複数個のスパイクが相手の膜

にHA₂の一部を埋め込むことで2つの膜を引き寄せ、一定面積以上の近接部を形成する作用と、スパイクどうしが膜上で会合し向かい合った脂質のみの膜領域を形成する作用が考えられる。

IFVは受容体の無イリポソームとも膜融合を生じたが、グリコフォリンを再構成すると膜融合の促進が見られた。これは脂質膜表面に非特異的吸着をしているHAよりも、受容体に特異的結合をしているHAの方が、酸性による構造変化に伴って効率よく相手の膜作用することを示している。実際の生体膜では受容体以外の膜蛋白質や中性糖脂質の糖鎖などが、HAと脂質層の直接の接触の障害となりうるので、このような受容体による相互作用の安定化が、吸着の段階だけではなく、外膜融合の段階でも重要であると考えられる。受容体の一定密度とHAスパイクの一定密度の両方が保証されて始めて、上述した複数個のスパイクの作用が効率良く生じるのである。

グリコフォリン再構成膜の場合、0.6%以上のグリコフォリン含量があれば、外膜融合は充分に促進された。再構成膜ではグリコフォリンが膜に対称的に埋め込まれていると思われるので、非対称的な赤血球膜では0.3%以上のグリコフォリン含量があれば外膜融合が安定化されるはずである。実際のヒト赤血球には8.5%^(68,69)のグリコフォリンが含まれている上に、ガングリオシドの糖鎖も受容体として働くので、赤血球表面にはIFVの外膜融合にとって十分な数の受容体が存在している。

Huang³はHAとNAの再構成膜が中性で細胞膜と膜融合を生じる⁽⁷⁰⁾こと、そしてこれにはNAが必要である⁽⁷¹⁾ことを、電子顕微鏡による観察から調べている。これは本研究の結果と大きく食い違いますが、フェリチン抗体を用いた免疫電顕法によって膜構成分子の混合が示されていないので、膜融合とは異なる現象を観察している可能性がある。保坂ら⁽⁷²⁾は界面活性剤NP-40を用いてHAとウイルス外膜

の脂質からHA再構成膜を調整し、本研究と一致する赤血球凝集活性やpH依存性の溶血活性を報告している。

IFV外膜融合の機構についての研究は今のところ、主にHAの構造変化とHAと相手の膜との反応に関心が集まっている。しかし、上述したような外膜上でのHAどうしの相互作用や、HAと外膜の脂質との相互作用の関与も重要な因子であろうと考える。この側面からの研究にHA再構成膜での解析が有効であろうと思われる。特に(6)節で述べたアルキル化したガラス上にHAを再構成した系では、顕微鏡下でHAを含む膜を観察できるので、HAを適当な蛍光試薬で標識すれば、¹⁵ 蛍光退色回復法による側方拡散の測定や、顕微鏡下での蛍光偏光解消法による回転運動の測定が可能となる。HAのこのような膜内での運動態状を調べることから、上の問題に取り組みたいと考えている。

最後に、最近藤田⁽¹³⁾はここで調整したような

HA再構成小胞にカルセインを封入し、赤血球ゴーストに吸着させると、酸性条件に限ってゴースト内部にカルセイン分子が拡散することを示した。またヒマ種子毒のリシンを封入したHA再構成膜は、効率良くMDCK細胞を殺す作用がわった。これによってpH依存性の膜融合活性を持った、エンドゾームを経由するマイクロカプセルの可能性が示された。

6、謝 辞

本研究を御指導して下さい、大西俊一教授に深く感謝します。IFVの外膜融合の発見者である故前田豊三博士は、私が研究活動をはじめたばかりの約1年間、懇切ていねいな指導をして下さり、本研究の出発点を与えて頂きました。心より哀悼の意を表します。フリーズフラクチャー像の観察に多大な御協力を頂いた、北里大学医学部の山科正平教授と大西研究室の吉村昭彦氏、そして共同研究をして下さった佐藤智博士に感謝いたします。最後に、5年間の研究生生活の間、常にあたたかい激ましと助言を頂いた、伊藤忠直助教授をはじめとする大西研究室の皆様、そして生物物理学教室の皆様に、厚くお礼を申し上げます。

7、文 献

1. Davis, B.D. et al. (eds) (1980) Microbiology including immunology and molecular genetics, third edition. Harper & Row, Publishers, Inc.
2. Maeda, T. and Ohnishi, S. (1980) FEBS Lett. 122, 283-287.
3. Tycko, B. and Maxfield, F.R. (1982) Cell 28, 643-651.
4. Galloway, C.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 3334-3338.
5. Morgan, C. and Howe, C. (1968) J. Virol. 2, 1122-1132.
6. White, J. et al. (1981) J. Cell Biol. 89, 674-679.
7. Huang, R.T.C. et al. (1981) Virology 119, 243-247.
8. Lenard, J. and Miller, D.K. (1981) Virology 110, 479-482.
9. Shibata, M. et al. (1982) J. Gen. Virol. 59, 183-186.
10. Ohuchi, M. et al. (1982) J. Virol. 42, 1076-1079.
11. Kitamae, F. et al. (1982) virology 73, 357-361.
12. Yoshimura, A. et al. (1982) J. Virol. 43, 284-293. (参考論文 2)
13. Yoshimura, A. and Ohnishi, S. (1984) J. Virol. 51, 497-504.
14. Väänänen, P. and Kääriäinen, L. (1979) J. Gen. Virol. 43, 593-601.
15. Väänänen, P. and Kääriäinen, L. (1980) J. Gen. Virol. 46, 467-475.
16. Scarano, F.G. et al. (1984) Virology 132, 222-225.
17. Mifune, K. (1982) FEBS Lett. 137, 293-297.
18. Redmond, S. et al. (1984) Virology 133, 393-402.
19. White, J. et al. (1983) Quart. Rev. Biophys. 16, 151-195.
20. 大西俊一, 吉村昭彦 (1984) ウイルス 34, 11-24

21. Wiley, D.C. et al. (1977) *Virology* 79, 446-448.
22. Laver, W.G. and Valentine, R.C. (1969) *Virology* 38, 105-119.
23. Wilson, I.A. et al. (1981) *Nature* 289, 366-373.
24. Schulze, I.T. (1975) in *Influenza Viruses and Influenza* (Kiebourne, E.D., ed.) pp.53-124, Academic Press.
25. Poulson, J.C. et al. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2120-2124.
26. Rogers, G.N. et al. (1983) *Virology* 131, 394-408.
27. 松永正之 (1983) 第56回日本生化学会抄録 755.
28. Lazarowitz, S.G. and Choppin, P.W. (1975) *Virology* 68, 440-454.
29. Klenk, H.D. et al. (1975) *Virology* 68, 426-439.
30. Maeda, T. et al. (1982) *Proc. Natl. Sci. USA.* 78, 4133-4137. (参考論文1)
31. Huang, R.T.C. et al. (1981) *Virology* 110, 243-247.
32. White, J.K. et al. (1981) *J. Cell Biol.* 89, 674-679.
33. Gething, M.-J. et al. (1980) *Nature* 287, 201-206.
34. White, J. et al. (1982) *Nature* 300, 658-659.
35. Hosaka, Y. et al. (1982) *Biken J.* 25, 51-62.
36. 川崎一則 未発表.
37. Skehel, J.J. et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 93-97.
38. Sato, S.B. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 3153-3157. (基礎となる論文1)
39. Doms, R.W. et al. (1985) *J. Biol. Chem.* submitted for publication.
40. Sato, S.B. and Ohnishi, S. (1984) *Sixth International Congress of Virology. Abstracts* p.283.
41. Daniels, R.S. (1983) in *The Origin of Pandemic Influenza Viruses* (ed. Laver, W.G.) pp 1-7. Elsevier Science Publishing Co, Inc.
42. Webster, R.G. et al. (1983) *Virology* 126, 587-599.
43. White, J. et al. (1982) *EMBO J.* 1, 217-222.

44. Membrane Reconstitution (ed. Poste, G. and Nicolson, G.L.) (1982)
Cell Surface Reviews Vol. 8. North Holland Publishing co.
45. Oxford, J.S. et al. (1981) J. Gen. Virol. 52, 329-343.
46. Thibodean, L. et al. (1981) in Genetic Variation among Influenza Viruses
pp587-600. Academic Press.
47. Singleton, W.S. et al. (1965) J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 53-56.
48. Hubbell, W.L. and McConnell, H.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 488,
36-42.
49. Lowry, O.H. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
50. Böhlen, P. et al. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155-213-220.
51. Bartlett, G.R. (1959) J. Biol. Chem. 243, 466-468.
52. Okada, Y. (1962) Exp. Cell Res. 26, 98-107.
53. Maeda, T. et al. (1975) Biochemistry 14, 3736-3741.
54. Volsky, D.J. and Loyter, S. (1978) FEBS Lett. 92, 190-194.
55. Steck, T.L. (1974) Methods in Membrane Biology Vol. 2 (ed. Korn, E.D.)
pp245-248. Plenum Press.
56. Segrest et al. (1979) Biochem. Biophys. Acta 554, 533-537.
57. MacDonald, R.I. and MacDonald, R.C. (1975) J. Biol. Chem. 250,
9206-9214.
58. Salk, J.E. (1944) J. Immunol. 49, 87-98.
59. von Tscharner, V and McConnell, H.M. (1981) Biophys. J. 36,
421-427.
60. Laemmli, V.K. (1970) Nature 227, 680-685.
61. Bächli, T. et al. (1977) in Virus Infection and the Cell Surface (ed.
Poste, G. and Nicolson, G.L.) Cell Surface Reviews Vol. 2 pp83-127
North-Holland Publishing Co.
62. Kawakami, K. et al. (1981) J. Biochem. 89, 1751-1757.

63. Kuroda,K. and Ohnishi,S (1983) J. Biochem. 94, 1809-1813.
64. Ishiguro,T. and Nakanishi,M. (1984) J. Biochem. 95, 581-583.
65. Klenk,H.D. et al. (1972) Virology 47, 579-591.
66. Ozawa,M. and Asano,A (1981) J. Biol. Chem. 256, 5954-5956.
67. Presti,F.T. et al. (1982) Biochemistry 21, 3831-3835. '
68. Rosenberg,S.A. and Guidotti,G. (1968) J.Biol.Chem. 243, 1985-1992.
69. Steck,T.L. (1974) J. Biol. Chem. 62, 1-19.
70. Huang,R.T.C. et al. (1980) Virology 104, 294-302.
71. Huang,R.T.C. et al. (1980) Virology 107, 313-319.
72. Hosaka,Y. et al. (1983) J. Virol. 46, 1014-1017.
73. 藤田 節. 修士論文